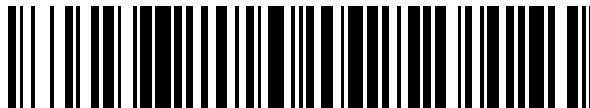


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 124**

51 Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2011 PCT/GB2011/050757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11128704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2011 E 11715607 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2558581**

54 Título: **Sistema de expresión de poxvirus**

30 Prioridad:

16.04.2010 GB 201006405

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.10.2018

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

COTTINGHAM, MATTHEW GUY

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 685 124 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de expresión de poxvirus

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos para insertar un transgén en un genoma de poxvirus y a vectores de poxvirus.
- [0002]** Los vectores virales se usan en múltiples aplicaciones tanto en investigación bioquímica básica como en medicina. Dichos vectores pueden obtenerse por ingeniería genética usando tecnología de ácido nucleico
10 recombinante y se usan para transferir un gen o genes de interés a una célula diana, lo que conduce a la expresión del gen o genes y a la producción del producto génico o productos codificados. Los vectores virales han encontrado aplicación en vacunas contra enfermedades infecciosas, en el tratamiento del cáncer y en la terapia génica.
- [0003]** Un grupo de virus que puede usarse como vectores virales son los poxvirus.
15
- [0004]** La construcción de un poxvirus recombinante capaz de expresar un transgén extraño se describió por primera vez a principios de la década de 1980 [Smith, GL, M. Mackett, y B. Moss, Nature, 1983. 302 (5908): págs. 490-5]. Desde entonces, se han desarrollado varias modificaciones de la técnica, pero todas se basan en la inserción
20 de un casete de expresión que comprende un promotor poxviral y el gen de interés en un locus específico en el genoma viral. Aunque se demostró por primera vez con el virus vaccinia, el desarrollo actual de vacunas recombinantes de poxvirus emplea principalmente vectores deficientes en replicación, principalmente virus vaccinia modificado de Ankara (MVA), un derivado atenuado del virus vaccinia que, a diferencia de su parental, no puede replicarse en células de mamíferos y, por lo tanto, tiene un perfil mejorado y seguro. También se ha desarrollado una cepa atenuada similar de virus vaccinia, NYVAC (véase Gomez, CE, y col., Curr Gene Ther, 2008. 8(2): págs.97-120 para una revisión), y
25 los poxvirus aviar, específicamente los virus de la viruela aviar y de la viruela del canario, también han encontrado aplicación como vectores de vacunas no replicantes en seres humanos (véase Skinner, MA, y col., Expert Rev Vaccines, 2005. 4(1): págs. 63 a 76 para una revisión).
- [0005]** A diferencia de la mayoría de virus, los poxvirus tienen su propia maquinaria molecular para la
30 transcripción que se produce en el citoplasma de las células infectadas, independientemente del aparato de transcripción nuclear del huésped. Con el fin de expresar un transgén en un poxvirus recombinante, es por lo tanto necesario colocarlo bajo el control de un promotor poxviral. La transcripción de poxviral se ha estudiado intensamente, y se han definido las secuencias consenso de promotores virales que tienen actividad en las diferentes etapas del ciclo de vida viral (conocidas como temprana, intermedia y tardía). Los mecanismos están bien conservados en
35 Poxviridae, de modo que, por ejemplo, un promotor del virus de la viruela aviar (un Avipoxvirus) funciona de manera equivalente cuando se inserta en el virus vaccinia (un Orthopoxvirus). Sin embargo, solo un puñado de promotores se ha utilizado en casetes de expresión transgénica. Estos son principalmente p7.5, el promotor mH5 (H5R modificado) y el promotor sintético corto.
- 40 **[0006]** Hay varias limitaciones teóricas asociadas con el sistema de expresión de poxvirus recombinante tradicional descrito anteriormente.
- El promotor usado en el casete de expresión transgénica ya existe en el genoma viral (tal vez con una secuencia ligeramente variante). Esto podría promover la recombinación homóloga entre las copias múltiples del promotor,
45 proporcionando potencialmente un mecanismo tanto para la recombinación ilegítima durante la construcción de recombinantes como para la inestabilidad genética de los recombinantes.
 - La inserción de un promotor altera el patrón de transcripción en o a través del locus de inserción, alterando potencialmente o afectando adversamente la expresión de genes vecinos al locus de inserción. Si los genes flanqueantes tienen papeles cruciales en el ciclo de vida viral, el virus recombinante puede mostrar propiedades de
50 crecimiento subóptimas, poniéndolo en una desventaja selectiva y agravando potencialmente cualquier problema de inestabilidad genética.
 - Si el virus recombinante debe expresar múltiples transgenes, la elección de los promotores y sitios de inserción disponibles actualmente es limitada.
 - Para aplicaciones de vacuna, no se ha establecido experimentalmente que los promotores actualmente disponibles
55 insertados en el (los) sitio(s) de inserción utilizado(s) hasta ahora dirija(n) la expresión del transgén para maximizar la inmunogenicidad del antígeno recombinante codificado.
- [0007]** Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento mejorado para crear un poxvirus recombinante para su uso como un vector viral.

[0008] La presente invención resuelve uno o más de los problemas técnicos anteriores proporcionando un procedimiento para insertar una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en un genoma de poxvirus, comprendiendo dicho procedimiento:

5

A) identificar en el genoma de poxvirus un marco de lectura abierto de poxvirus en el que dicho marco de lectura abierto se caracteriza por un codón de inicio ATG inicial y en el que la expresión de dicho marco de lectura abierto es activada por un promotor de poxvirus unido de forma operacional ubicado aguas arriba del marco de lectura abierto y en el que la expresión de dicho marco de lectura abierto proporciona un péptido que no es esencial para la viabilidad del poxvirus; e

10

B) insertar la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido extraño en una posición aguas abajo del promotor de poxvirus; en el que después de dicha inserción,

15

(i) el ácido nucleico que codifica el péptido extraño está unido de forma operacional al promotor de poxvirus y la expresión de dicho ácido nucleico es activada por dicho promotor de poxvirus; y

(ii) la traducción del péptido extraño se inicia en un codón de inicio ATG ubicado en la misma posición con respecto al promotor de poxvirus que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto de poxvirus, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en fase con e inmediatamente después del codón de inicio

20

la secuencia de ácido nucleico se inserta junto con un codón de inicio en la posición previamente ocupada por el codón de inicio inicial del marco de lectura abierto de poxvirus.

25

[0009] Los presentes inventores han demostrado que se puede crear un poxvirus recombinante que expresa una secuencia de ácido nucleico de interés sin la necesidad de insertar un promotor en tándem con la secuencia de ácido nucleico de interés. En cambio, la secuencia de ácido nucleico de interés se coloca bajo el control de un promotor ya presente en el genoma viral. El patrón de transcripción a través del locus de inserción se interrumpe mínimamente en comparación con los procedimientos anteriores. Además, como un promotor no necesita insertarse en tándem con la secuencia de ácido nucleico de interés, la secuencia de ácido nucleico de interés puede ser más larga de lo que de otro modo sería posible.

30

[0010] En una realización, en un poxvirus recombinante según la presente invención, el promotor activará la expresión de la secuencia de ácido nucleico de interés insertada, en lugar de su ORF natural; como resultado, la transcripción del ORF natural se verá gravemente afectada debido a la inserción de la secuencia de ácido nucleico de interés. Por lo tanto, es importante que el producto del ORF viral reemplazado no afecte al fenotipo deseado del producto de virus recombinante. En una realización, en el caso de una vacuna, el fenotipo deseado consiste en (i) velocidad de crecimiento, rendimiento y productividad indistinguibles (o mejorados) en comparación con los recombinantes basados en virus de tipo silvestre; y (ii) inmunogenicidad indistinguible (o mejorada) en comparación con recombinantes basados en virus de tipo silvestre.

35

40

[0011] En una realización, la secuencia de ácido nucleico a insertar codifica un péptido extraño. Por tanto, en una realización, «extraño» significa cualquier péptido que no está codificado por ninguna secuencia presente de manera natural en un genoma de poxvirus.

45

[0012] En una realización, el término «péptido» significa cualquier polímero formado a partir de monómeros de aminoácidos, en el que los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos y en el que, una vez unidos, los monómeros de aminoácidos se denominan restos de aminoácidos. Por tanto, en una realización, «péptido» abarca cualquiera y todos los polipéptidos y proteínas. En una realización, un péptido adecuado para su uso en la presente invención comprende al menos 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 o 16000 restos de aminoácidos.

50

[0013] En una realización, «marco de lectura abierto» (ORF) significa una longitud de secuencia de ácido nucleico que corre en una dirección aguas abajo desde un locus contiguo a un codón de inicio, y que puede codificar potencialmente un producto génico. Un marco de lectura abierto puede estar unido de forma operacional a una secuencia promotora.

55

[0014] En una realización, «codón de inicio» significa cualquier codón en una secuencia de ADN que, cuando se transcribe en ARN mensajero, indicaría el punto en el que comienza la traducción del ARNm a proteína. Un codón

de inicio marca el comienzo de un ORF. Por tanto, en una realización, el codón de inicio es ATG. En una realización, un codón de inicio ATG inicial es el primer codón de inicio ATG al comienzo de un ORF.

[0015] En una realización, «unido de forma operacional» significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen están dispuestas de modo que funcionen en concierto para sus fines previstos, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y transcurre a través del segmento de polinucleótido codificante al terminador.

[0016] En una realización, la expresión del ORF es activada por un promotor de poxvirus unido de forma operacional ubicado aguas arriba del ORF. En una realización, «aguas arriba» significa una ubicación en una secuencia de ácido nucleico ubicada 5' en un punto de referencia dado en esa secuencia de ácido nucleico. Por tanto, en una realización, el promotor está ubicado en el genoma de poxvirus en una ubicación 5' del ORF, cuando se considera la cadena codificante de ADN. En una realización, el promotor está ubicado en el genoma de poxvirus en una ubicación entre 1 y 1000 nucleótidos (por ejemplo, entre 100 y 500, entre 50 y 200, entre 25 y 100, o entre 10 y 50) aguas arriba del ORF, preferiblemente entre 1 y 1000 nucleótidos (por ejemplo, entre 100 y 500, entre 50 y 200, entre 25 y 100, o entre 10 y 50) aguas arriba del ATG inicial del ORF.

[0017] En una realización, la expresión del marco de lectura abierto proporciona un péptido que no es esencial para la viabilidad del poxvirus. Por tanto, en una realización, «no esencial» significa que el producto del ORF no se requiere para el fenotipo de poxvirus deseado. Como tal, un ORF de poxvirus no esencial puede volverse funcionalmente inactivo (véase a continuación) sin que esto tenga ningún efecto sobre los rasgos virales deseados, que incluyen (pero sin limitación) la velocidad de crecimiento, el rendimiento y la productividad. Por tanto, en una realización, «viabilidad» significa la capacidad del poxvirus para crecer y funcionar adecuadamente.

[0018] En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido extraño se inserta en una posición aguas abajo del promotor de poxvirus. En una realización, «aguas abajo» significa una ubicación en una secuencia de ácido nucleico ubicada 3' de un punto de referencia dado en esa secuencia de ácido nucleico. Por tanto, en una realización, la secuencia de ácido nucleico se inserta en el genoma de poxvirus en una ubicación 3' del promotor, cuando se considera la cadena codificante de ADN.

[0019] En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido extraño se inserta aguas arriba o aguas abajo del codón de inicio ATG inicial. Por tanto, en una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido extraño se inserta aguas arriba del codón de inicio ATG inicial. En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido extraño se inserta aguas abajo del codón de inicio ATG inicial.

[0020] En una realización, el ácido nucleico que codifica el péptido extraño está unido de forma operacional al promotor de poxvirus y la expresión de dicho ácido nucleico es activada por dicho promotor de poxvirus. Por tanto, en una realización, la transcripción se inicia en el promotor de poxvirus y transcurre a lo largo de la secuencia de ácido nucleico insertada, produciendo así un ARNm que codifica el péptido extraño y que conduce a la expresión del péptido extraño.

[0021] En una realización, la traducción del péptido extraño se inicia en un codón de inicio ATG ubicado en la misma posición con respecto al promotor de poxvirus que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto de poxvirus. Por tanto, en una realización, el procedimiento mediante el cual se traduce un ARNm que codifica el péptido extraño en una secuencia peptídica comienza en un codón de inicio ATG. En una realización, «misma posición» significa que el codón de inicio ATG ocupa la misma posición en el genoma de poxvirus que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto de poxvirus. Por tanto, en una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en el genoma de poxvirus en fase con el codón de inicio del marco de lectura abierto de poxvirus. Por tanto, en una realización, el promotor de poxvirus que previamente activó la expresión del marco de lectura abierto de poxvirus puede activar la expresión de la secuencia de ácido nucleico insertada.

[0022] En una realización, «funcionalmente inactivo» significa que la transcripción del ORF de poxvirus tiene lugar a una frecuencia reducida en comparación con un poxvirus que carece de la secuencia de ácido nucleico insertada. En una realización, la transcripción del ORF de poxvirus no puede tener lugar. Por tanto, en una realización, la expresión del producto del ORF de poxvirus no puede tener lugar. Por tanto, en una realización, la inserción del transgén actúa para separar el ORF de poxvirus de cualquier promotor unido de forma operacional, de modo que el ORF de poxvirus se vuelve funcionalmente inactivo.

[0023] Las secuencias de ácido nucleico que codifican un péptido extraño adecuado para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican cualquiera de los

siguientes: antígenos, adyuvantes (incluidos productos génicos virales, bacterianos y eucariotas), productos génicos expresado por tumores o cánceres, productos génicos antitumorales/anticancerosos, enzimas, indicadores y receptores.

5 **[0024]** Un ejemplo de un antígeno (que puede ser el péptido extraño que está codificado por la secuencia de ácido nucleico) adecuado para su uso en la presente invención es el antígeno METRAP. Por tanto, en una realización, el gen codifica el antígeno METRAP. Además, ejemplos no limitantes de antígenos adecuados para su uso en la presente invención incluyen: TRAP plasmodial (proteína de adhesión relacionada con trombospondina), proteína de superficie de merozoita 1, antígeno de membrana apical 1, proteína circumsporozoita, micobacteriana 85A,
10 micobacteria 85B, nucleoproteína de influenza, matriz proteína 1 o 2, NS1, hemaglutinina, neuraminidasa y todas las proteínas del VIH.

[0025] Un ejemplo de un adyuvante (que puede ser el péptido extraño que está codificado por la secuencia de ácido nucleico) adecuado para su uso en la presente invención es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Por tanto, en una realización, el gen codifica GM-CSF. Además, ejemplos no limitantes de adyuvantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen: 4-1BBL; B7.1, B7.3, CD40L, OX40L.

[0026] Un ejemplo de un producto génico expresado por un tumor o cáncer adecuado para su uso en la presente invención es un antígeno específico de tumor. A este respecto, un antígeno específico de tumor es una proteína o molécula que es particular para una célula tumoral o está presente en la célula tumoral en una abundancia mucho mayor en comparación con una célula no tumoral.

[0027] Es evidente a partir de lo anterior que cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño puede usarse en la presente invención, y que no hay intención de limitar la presente invención al uso de una cualquiera secuencia particular de ácido nucleico o péptido extraño. Una persona experta estará familiarizada con otros péptidos y/o proteínas de enzima, indicador y receptor que serían adecuados para su uso en la presente invención.

[0028] En una realización, el marco de lectura abierto de poxvirus no es ninguno de los marcos de lectura abiertos de MVA descritos en la patente europea EP 1689872-B1. Por tanto, en una realización, el marco de lectura abierto de poxvirus no es ninguno de los siguientes marcos de lectura abierta de MVA descritos en la patente europea EP 1689872-B1: A42R (también conocido como MVA154R); J6R (MVA090R); C7L (también conocido como MVA018L); B9R (también conocido como MVA177R). Además, la patente EP 1689872-B1 también describe el marco de lectura abierto MVA «F6R»: se desconoce la existencia de este ORF y puede tratarse de un error tipográfico que hace referencia a F6L (también conocido como MVA035L) o E6R (también conocido como MVA053R). Por tanto, en una realización, el marco de lectura abierto de poxvirus no es ninguno de: F6L (también conocido como MVA035L) o E6R (también conocido como MVA053R). La patente EP 1689872-B1 también describe el marco de lectura abierto MVA «I2R» (también escrito en la patente EP 1689872-B1 como «I2R»): se desconoce la existencia de este ORF y puede tratarse de un error tipográfico que hace referencia a I2L (también conocido como MVA063L). Por tanto, en una
40 realización, el marco de lectura abierto de poxvirus no es I2L (también conocido como MVA063L).

[0029] En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño carece de cualquier promotor capaz de activar la expresión del péptido extraño. Por tanto, en una realización, la secuencia de ácido nucleico que se inserta carece de cualquier promotor.

[0030] En una realización, después de la inserción de la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño, al menos parte del marco de lectura abierto de poxvirus permanece presente en el genoma de poxvirus. Por tanto, en una realización, la inserción del ácido nucleico conduce a la eliminación de solo una parte del ORF de poxvirus. En una realización, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600,
50 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos en el ORF de poxvirus permanecen presentes en el genoma de poxvirus.

[0031] En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en fase con e inmediatamente después del codón de inicio ATG inicial. En una realización, «en fase» significa ubicado en una ubicación de un múltiplo de tres nucleótidos distante de una ubicación de referencia dada, permitiendo así que la traducción transcurra del codón de inicio ATG (la referencia para «en fase») y traduzca correctamente la secuencia de la secuencia de ácido nucleico de interés.

[0032] En una realización, el segundo codón (es decir, el primer codón que sigue inmediatamente después del codón de inicio) de la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño está tras la inserción ubicado en

una posición de nucleótidos cero desde la posición del codón de inicio ATG inicial del marco de lectura abierto de poxvirus (*es decir*, inmediatamente adyacente a la posición del codón de inicio ATG inicial del marco de lectura abierto de poxvirus, en una dirección aguas abajo).

- 5 **[0033]** En una realización, se identifica un genoma de poxvirus de la etapa A) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7 y en el que el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7.
- 10 **[0034]** En una realización, se identifica un genoma de poxvirus de la etapa A) que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10 y en el que el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10.
- 15 **[0035]** Por tanto, en una realización, el genoma de poxvirus comprende la SEQ ID NO: 1 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 1. En una realización, el genoma de poxvirus comprende la SEQ ID NO: 2 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 2. En una realización, el genoma de poxvirus comprende la SEQ ID NO: 3 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 3. En una realización, el
 20 genoma de poxvirus comprende la SEQ ID NO: 4 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 4. En una realización, el genoma de poxvirus comprende la SEQ ID NO: 5 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 5. En una realización, el genoma de poxvirus comprende la SEQ ID NO: 6 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 6. En una realización, el genoma del poxvirus comprende la SEQ ID NO: 7 y el codón
 25 de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 7. En una realización, el genoma del poxvirus comprende la SEQ ID NO: 8 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 8. En una realización, el genoma del poxvirus comprende la SEQ ID NO: 9 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 9. En una realización, el genoma del poxvirus comprende la SEQ ID NO: 10 y el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en
 30 las posiciones 26-28 de SEQ ID NO: 10.
- [0036]** En una realización, el genoma de poxvirus comprende una secuencia que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7, en el que las posiciones de secuencia 26-28 de la secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una
 35 cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7 leen ATG. Por tanto, en una realización, el genoma de poxvirus comprende una secuencia que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7, en el que las posiciones 26-28 están inalteradas y siguen siendo ATG.
- [0037]** En una realización, el genoma de poxvirus comprende una secuencia que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10, en el que las posiciones de secuencia 26-28 de la secuencia que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una
 40 cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10 leen ATG. Por tanto, en una realización, el genoma de poxvirus comprende una secuencia que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10, en el que las posiciones 26-28 están inalteradas y siguen siendo ATG.
 45
- [0038]** En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en fase con e inmediatamente después del ATG ubicado en las posiciones 26-28 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7.
- [0039]** En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en fase
 50 con e inmediatamente después del ATG ubicado en las posiciones 26-28 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10.

SEQ ID NO	Secuencia	Posición de A del ATG indicado en Genbank U94848§
1	<i>cagtagtcaataacaaacaacaccATGagatatattataattctcgagttt</i>	157621 (cadena superior)
2	<i>tattttatcgttgggtttactactATGgggtttgcattccattgagatcaa</i>	33771 (cadena inferior)
3	<i>gcaaactgtatgtcaatctggacaATGgattacatatcctaaggcattagtat</i>	24694 (cadena inferior)
4	<i>tagtctgatattatgagtgccagcaATGgccgtgtacgcggttactgggtgtg</i>	15377 (cadena inferior)
5	<i>ttgatattaacaaaagtgaatatATGttaataattgtattgtattatacg</i>	44810 (cadena superior)
6	<i>agcataaacacaaaatccatcaaaaATGtgataaattatctgatgtttgtgt</i>	10203 (cadena superior)
7	<i>ctcgggtgggtacgacgagaatcttATGccttccctggaatatcatcgactgt</i>	152144 (cadena superior)
8	<i>ctgggtgtgttagttctctctaaaaATGtctaagatctatattgacgagcgtt</i>	43269 (cadena inferior)
9	<i>tgatctcgtgtgtacaaccgaaatcATGgcgatgttttacgacacgctctcg</i>	152095 (cadena superior)
10	<i>tattgatagttatataacgtgaatcATGagtgcaaacgtatgttcaatctgg</i>	24725 (cadena inferior)

Antoine, G., y col., Virology, 1998. 244(2): págs. 365-96.

[0040] Las SEQ ID NOs 9 y 10 representan sitios de inserción alternativos para los ORF *B2R* y *K6L*, respectivamente. Por tanto, la SEQ ID NO: 9 está ubicada 49 pb 5' con respecto al ATG usado en BG08, y la 5 SEQ ID NO: 10 está ubicada 31 pb 5' con respecto al ATG usado en BG04 (véase la Tabla 1 a continuación).

[0041] En una realización, la parte en cursiva de las secuencias anteriores (SEQ ID NOs: 1-7) se reemplaza por la secuencia de ácido nucleico insertada tras la inserción de la secuencia de ácido nucleico en el genoma de poxvirus.

[0042] En una realización, la parte en cursiva de las secuencias anteriores (SEQ ID NOs: 1-10) se reemplaza por la secuencia de ácido nucleico insertada tras la inserción de la secuencia de ácido nucleico en el genoma de poxvirus.

[0043] En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta mediante recombinación homóloga.

[0044] En una realización, el gen se inserta en el genoma de poxvirus usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, en una realización, el gen se inserta en el genoma de poxvirus usando un procedimiento seleccionado de entre: ingeniería genética mediada por recombinación de un clon bacteriano del cromosoma artificial del genoma de poxvirus; recombinación homóloga en células infectadas por virus; ligadura; recombinación específica de sitio. Estos procedimientos se describen con más detalle a continuación.

[0045] La ingeniería genética mediada por recombinación de un clon bacteriano del cromosoma artificial del genoma de poxvirus se describe en Cottingham, MG, y col., PLoS ONE, 2008. 3 (2): pág. e1638. Para usar este procedimiento, se debe obtener un clon del cromosoma artificial bacteriano de longitud completa (BAC) del genoma de poxvirus como se describe en Cottingham y col., y en la patente de los EE. UU. n.º 7494813. Este clon puede modificarse genéticamente usando el sistema de recombinación lambda rojo, en el que las enzimas lambda recombinasa Exo, Bet y Gam se inducen en la bacteria, generalmente a través de un promotor inducible por calor, para promover la recombinación entre el BAC y la secuencia de interés, a las cuales se han añadido secuencias homólogas al locus de recombinación deseado por procedimientos convencionales. El clon BAC se convierte a continuación en un virus infeccioso («rescatado») mediante transfección en células infectadas con un virus auxiliar no replicante, por ejemplo, el virus de la viruela aviar en células BHK.

[0046] La recombinación homóloga en células infectadas con virus es un procedimiento tradicional, descrito en Smith, GL, M. Mackett, y B. Moss, Nature, 1983. 302 (5908): págs. 490-5. Se construye un plásmido lanzadera que contiene secuencias flanqueantes homólogas al sitio de inserción deseado, y se transfecta a células infectadas con virus. Los eventos espontáneos de recombinación de baja frecuencia en las células infectadas darán lugar al recombinante deseado a baja frecuencia, y se usa un marcador genético seleccionable, tal como una enzima o proteína fluorescente para purificar los recombinantes raros de la mayoría no recombinante.

[0047] Recombinación específica de sitio: en este procedimiento, las secuencias específicas, tales como sitios LoxP o FRT, primero se insertarán mediante uno de los dos procedimientos anteriores. A continuación, se usa una

recombinasa específica de sitio tal como Cre o Flp para insertar la secuencia deseada, que también se ha obtenido por ingeniería para contener las secuencias específicas, en el locus previamente modificado.

5 **[0048]** Para la ligadura, se usa ADN genómico poxviral (procedente de virus o BAC) como sustrato para la clonación convencional usando enzimas de restricción y ligasas, antes del rescate viral, como se describió anteriormente.

10 **[0049]** En una realización, se inserta un codón de inicio con la secuencia de ácido nucleico, en la que el codón de inicio insertado reemplaza el codón de inicio ATG inicial. Por tanto, en una realización, la secuencia de ácido nucleico se inserta junto con un codón de inicio en la posición previamente ocupada por el codón de inicio inicial del ORF de poxvirus; el ORF de poxvirus se separa así del codón de inicio.

15 **[0050]** En una realización, el procedimiento de la presente invención se repite con el fin de insertar una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en un genoma de poxvirus. Por tanto, en una realización, el procedimiento de la presente invención se usa para insertar una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en un genoma de poxvirus; el procedimiento se repite a continuación con el fin de insertar una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en el mismo genoma de poxvirus en una ubicación diferente de la primera secuencia de ácido nucleico. En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica un antígeno, y la segunda secuencia de ácido nucleico codifica un adyuvante. En otra realización, el procedimiento de la presente invención se repite adicionalmente con el fin de insertar al menos una tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, 10ª, 12ª o 15ª secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en el genoma de poxvirus. Cada secuencia de ácido nucleico adicional puede insertarse en una ubicación diferente de las ubicaciones de las inserciones de secuencias de ácidos nucleicos anteriores.

25 **[0051]** Cualquier poxvirus es adecuado para su uso con la presente invención.

[0052] En una realización, el poxvirus se selecciona de entre: virus vaccinia, virus vaccinia Ankara modificado (MVA), NYVAC, virus de la viruela aviar y virus de la viruela del canario.

30 **[0053]** En una realización, el poxvirus es MVA. Por tanto, en una realización, la invención proporciona un procedimiento para insertar una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en un genoma de MVA.

35 **[0054]** En comparación con su parental, el virus vaccinia, MVA carece por completo de aproximadamente 26 de los aproximadamente 200 marcos de lectura abiertos. Otros 21 aproximadamente son pseudogenes fragmentados. Además, al menos 23 ORF tienen mutaciones que son particulares de MVA (*es decir*, que no se encuentran en los poxvirus no atenuados). Además, incluso los genes que se conservan en MVA pueden no ser esenciales para el fenotipo deseado. Las tres últimas categorías representan genes cuyos promotores pueden ser dirigidos a la expresión transgénica utilizando la estrategia descrita en este ejemplo. Una ventaja del uso de MVA es que algunos de los ORF de MVA poseen mutaciones graves, como la fragmentación y el truncamiento, que dan como resultado la expresión de productos genéticos que carecen de bioactividad (*p. ej.*, B8R), lo que los convierte en objetivos ideales. Esto no limita la aplicabilidad de la técnica a MVA, sin embargo, dado que los genes ya inactivados no son los únicos objetivos posibles.

45 **[0055]** En una realización, una aplicación potencial de la presente invención es la inducción de células TCd8+ específicas del producto transgénico mediante vacunación con MVA recombinante.

[0056] En una realización, el ORF de poxvirus se selecciona de entre los siguientes ORF de MVA: 176R, 041L, 027L, 157L, 052R, 005R y 168R. En una realización, el ORF de poxvirus se selecciona de entre fragmentos o variantes de los ORF de MVA enumerados anteriormente. En una realización, el ORF de poxvirus se selecciona de entre un fragmento o variante que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con uno de los ORF de MVA enumerados anteriormente.

55 **[0057]** En una realización, el poxvirus es virus vaccinia. Por tanto, en una realización, la invención proporciona un procedimiento para insertar un gen en un genoma del virus vaccinia.

[0058] En una realización, el ORF de poxvirus se selecciona de entre los siguientes ORF de virus vaccinia: B8R, F11L, K6L, A44L, E5R, C11R y B2R. Estos ORF de virus vaccinia son los ortólogos, respectivamente, de los ORF de MVA 176R, 041L, 027L, 157L, 052R, 005R y 168R. En una realización, el ORF de poxvirus se selecciona de entre los fragmentos o variantes de los ORF de virus vaccinia enumerados anteriormente. En una realización, en el

contexto del virus vaccinia, el ORF de poxvirus se selecciona de entre un fragmento o variante que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con uno de los ORF de virus vaccinia anteriormente enumerados.

5 **[0059]** En una realización, el ORF de poxvirus se identifica usando un análisis predictivo del genoma de poxvirus. Por tanto, en una realización, se usa un programa informático para buscar la secuencia del genoma de poxvirus con el fin de identificar los ORF de poxvirus. Dichos ORF se pueden identificar como que comienzan con un codón de inicio y que tienen una longitud de al menos 25 codones (por ejemplo, 25, 30, 40, 50, 100 o más de 100 codones). Un ORF puede estar seguido de un codón de parada. Los ORF se pueden identificar en otro poxvirus y a
10 continuación se identifica el ORF ortólogo en el poxvirus que se usa. Como alternativa, los transcritos correspondientes a los marcos de lectura abiertos pueden detectarse bioquímicamente, por ejemplo, mediante transferencia de Northern, RCP en tiempo real o análisis de microarrays.

[0060] Tal como se usa en esta invención, «codón de parada» significa cualquier codón en una secuencia de
15 ADN que, cuando esa secuencia se transcribe en ARN mensajero (ARNm), indicaría el punto en el cual se detiene la traducción del ARNm a proteína. Por tanto, en una realización, el codón de parada se selecciona de entre: TAG, TAA y TGA (equivalentes a UAG, UAA y UGA, respectivamente, en ARNm). En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño comprende un codón de parada.

20 **[0061]** Ejemplos de ORF de poxvirus que los inventores creen que son no esenciales (como se definió anteriormente) y, por tanto, adecuados para su uso en la presente invención se proporcionan a continuación. Los ORF enumerados son ORF anotados en las entradas de GenBank. Los nombres de ORF se encuentran en GenBank U94848 [Antoine, G., y col., Virology, 1998. 244 (2): págs. 365-96]. Sin embargo, otros ORFs no anotados así en GenBank también pueden ser adecuados. La siguiente lista no pretende ser exhaustiva o limitante de ninguna manera.

25 **[0062]** MVA020L (virus vaccinia N1L - truncado en MVA y también eliminado en NYVAC);
MVA034L (virus vaccinia F5L - fragmentado en MVA);
MVA037L (virus vaccinia F8L - no esencial en el virus vaccinia);
MVA158R (virus de la vacuna A45R - conocido por no afectar la velocidad de crecimiento del virus vaccinia o la
30 virulencia y tiene una eliminación interna de 12pb específica de MVA);
MVA008R (virus vaccinia WR-C12L, también conocido como WR013, un factor de virulencia del virus vaccinia que no afecta el crecimiento, no afecta el crecimiento de MVA o la inmunogenicidad, y también tiene una eliminación de 18pb específica de MVA y otras mutaciones);
MVA060L (virus vaccinia O1L - fragmentado en MVA), con inserción de taaaata 32 pb aguas arriba del iniciador ATG
35 para restaurar al promotor supuesto una secuencia idéntica a la encontrada en este locus en el virus vaccinia; el ORF de 48 pb de longitud inmediatamente aguas arriba de MVA027L, cuyos primeros 14 codones codifican los mismos aminoácidos que el virus vaccinia;
MVA022L (virus vaccinia K1L - eliminado parcialmente en MVA);
MVA036L (virus vaccinia F7L - conocido por no afectar el crecimiento del virus vaccinia y tiene una eliminación de
40 36bp específica de MVA);
MVA021L (virus vaccinia N2L - tiene también varias mutaciones específicas de MVA);
MVA019L (virus vaccinia C6L - no esencial en MVA);
MVA018L (virus vaccinia C7L - no esencial en MVA);
MVA065L (virus vaccinia I4L);
45 MVA032L;
MVA061L;
MVA086R, que también se elimina en NYVAC;
MVA161R;
MVA001L (virus vaccinia C23L);
50 MVA002L (virus vaccinia C19L);
MVA004L (virus vaccinia C17L);
MVA007R (virus vaccinia WR011/012);
MVA013L (virus vaccinia WR014);
MVA016L (virus vaccinia C9L);
55 MVA026L (virus vaccinia K5L);
MVA136L (virus vaccinia A25L);
MVA137L (virus vaccinia A26L - eliminado en NYVAC);
MVA150R (virus vaccinia A39R);
MVA164R (virus vaccinia A51R);

MVA166R (virus vaccinia A57R);
 MVA171R (virus vaccinia B4R);
 MVA181R (virus vaccinia B13R - eliminado en NYVAC);
 MVA187R (virus vaccinia B19R);

- 5 MVA188R (sin virus vaccinia ortólogo pero hay un ortólogo en el virus variola); MVA177R (virus vaccinia B9R - un ORF fragmentado en virus vaccinia también);
 MVA178R (virus vaccinia B10R - un ORF fragmentado en virus vaccinia también). Cuando el ORF está en la repetición de terminal invertido, solo se proporciona una de sus dos designaciones. Cuando un ORF está fragmentado, solo se proporciona el ORF aguas arriba (5'-más), ya que este en lugar del fragmento aguas abajo se encuentra adyacente al promotor supuesto.

[0063] MVA156R (virus vaccinia SalF6R);

MVA180R (virus vaccinia B12R);
 MVA054R (virus vaccinia E7R);

- 15 MVA025L (virus vaccinia K4L);
 MVA154R (virus vaccinia A42R - tiene una eliminación de 15 pb en MVA); MVA023L (virus vaccinia K2L);
 MVA149L (virus vaccinia A38L);
 MVA035L (virus vaccinia F6L);
 MVA044L (virus vaccinia);
 20 MVA045L (virus vaccinia F15L);
 MVA046L (virus vaccinia);
 MVA081R (virus vaccinia L2R);
 MVA130L (virus vaccinia A19L);
 MVA148R (virus vaccinia A37R);
 25 MVA162R (virus vaccinia A49R);
 MVA174R (virus vaccinia B6R);
 MVA179R (virus vaccinia B11R);
 MVA185L (virus vaccinia B17L);
 MVA141.5R (virus vaccinia A30.5L);
 30 MVA044.5L (virus vaccinia F14.5L).
 MVA006L (virus vaccinia C10L);
 MVA017L (virus vaccinia C8L);
 MVA160L (virus vaccinia A47L);
 MVA189R (virus vaccinia B22R);
 35 MVA142R (virus vaccinia A31R). Cuando el ORF está en la repetición de terminal invertido, solo se proporciona una de sus dos designaciones.

[0064] MVA029L (virus vaccinia F1L);

MVA031L (virus vaccinia F3L);

- 40 MVA152R (virus vaccinia A40R);
 MVA155R (virus vaccinia A43R);
 MVA183R (virus vaccinia B15R, también conocido como WR-B14R).
 MVA175R (virus vaccinia B7R)
 MVA159R (virus vaccinia A46R);
 45 MVA153L (virus vaccinia A41L, que codifica una proteína de unión a quimiocina);
 MVA184R (virus vaccinia B16R, también conocido como WR-B15R, que codifica una proteína de unión a IL-1 β);
 MVA028R (virus vaccinia K7R);
 MVA186R (virus vaccinia COP-B18R, también conocido como 68k-Ank, NB no WR-B18R);
 MVA024L (virus vaccinia K3L);
 50 MVA050L (virus vaccinia E3L);
 MVA076R (virus vaccinia G6R);
 MVA125.5L (virus vaccinia A14.5L);
 MVA146R (virus vaccinia A35R).

- 55 **[0065]** Los siguientes ORF son ejemplos de ORF que los inventores creen que son adecuados para su uso en la presente invención en el contexto de virus vaccinia o NYVAC o variantes procedentes de estas cepas si se conservan en NYVAC. Estos son C5L; C4L; C3L; C2L; C1L; C16L; C15L; C14L (también conocido como WR B23R); C12L; C22L; C21L; C20L; M1L; M2L; A52R; el ORF que codifica CrmC; A55R; B20R; C10L; C11L; y B21R.

[0066] Los ORF que están truncados, fragmentados o mutados en el virus vaccinia en comparación con los poxvirus silvestres también pueden ser adecuados para su uso en la presente invención.

[0067] El vector de vacuna FP9 se obtuvo del virus de la viruela aviar de tipo silvestre exactamente de la misma manera que se obtuvo el MVA del virus vaccinia. Por lo tanto, los mismos argumentos se aplican a la identificación de genes o genes fragmentados o truncados con mutaciones específicas de paso como ORF candidatos para su uso en la presente invención.

[0068] Los siguientes ORF de MVA o sus ortólogos en especies y cepas de *Orthopoxvirus* (u otros *Poxviridae*) son esenciales y, por lo tanto, no son adecuados para su uso en la presente invención: MVA030L, MVA038L, MVA039L, MVA042L, MVA047R, MVA048L, MVA051L, MVA053R, MVA055R, MVA056L, MVA057R, MVA058L, MVA062L, MVA063L, MVA066L, MVA067L, MVA068L, MVA069R, MVA070L, MVA071L, MVA072R, MVA073L, MVA074R, MVA075R, MVA077L, MVA078R, MVA079R, MVA080R, MVA082L, MVA083R, MVA084R, MVA085R, MVA087R, MVA088R, MVA089L, MVA090R, MVA091L, MVA092R, MVA093L, MVA094L, MVA095R, MVA096R, MVA098R, MVA099L, MVA100R, MVA101R, MVA102R, MVA103R, MVA104R, MVA105L, MVA106R, MVA107R, MVA108L, MVA109L, MVA110L, MVA111L, MVA112L, MVA113L, MVA114L, MVA115L, MVA116R, MVA117L, MVA118L, MVA119R, MVA120L, MVA121L, MVA122R, MVA123L, MVA124L, MVA125L, MVA126L, MVA127L, MVA128L, MVA129R, MVA131L, MVA132R, MVA133R, MVA134R, MVA135R, MVA138L, MVA139L, MVA140L, MVA141L, MVA143L, MVA163R, MVA167R, MVA097R y MVA064L; y el pequeño ORF entre MVA061 y MVA062 que recientemente se ha denominado O3L en el virus vaccinia.

[0069] MVA contiene muchas mutaciones en comparación con su virus parental, el virus vaccinia (y el virus vaccinia puede contener mutaciones en comparación con los poxvirus silvestres). Si una mutación del marco está presente cerca del inicio de un ORF, puede estar presente un ATG alternativo, lo que significa que un ORF todavía está presente y, por lo tanto, puede anotarse en una secuencia genómica, pero comienza con un ATG anormal. Normalmente, el ATG anormal podría estar ausente, o podría ser parte de un ORF muy pequeño de solo unas pocas decenas de nucleótidos, que típicamente se considera que no representan ORF traducibles genuinos durante la anotación del genoma. Por tanto, por analogía, cualquiera de los virus vaccinia especificados o los ORF de MVA, o los de otros poxvirus, pueden anotarse en el genoma basándose en un ATG que no represente el ATG auténtico del ORF de tipo silvestre.

[0070] Todas las realizaciones descritas anteriormente se aplican igualmente al vector poxvirus de la presente invención (descrito a continuación).

[0071] Un vector de poxvirus que se puede obtener mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente se describe en esta invención.

[0072] En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de poxvirus que comprende:

- 40 al menos un transgén;
- en el que dicho transgén comprende un promotor de poxvirus y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño, y en el que dicho promotor de poxvirus está ubicado aguas arriba de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño;
- en el que dicho promotor de poxvirus está unido de forma operacional a dicha secuencia de ácido nucleico y la expresión de dicha secuencia nucleica está activada por dicho promotor de poxvirus;
- 45 en el que el promotor de poxvirus es un promotor que activa la expresión de un marco de lectura abierto que no es esencial para la viabilidad de un poxvirus de origen natural;
- en el que dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño incluye un codón de inicio ATG ubicado en la misma posición con respecto al promotor de poxvirus que el codón de inicio ATG de dicho marco de lectura
- 50 abierto de poxvirus no esencial; y
- en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño está en fase con e inmediatamente después del codón de inicio de ATG inicial; o
- la secuencia de ácido nucleico junto con un codón de inicio ocupa la posición previamente ocupada por el codón de inicio ATG inicial del marco abierto de poxvirus.

55 En una realización, «transgén» significa un gen que no está presente de forma natural en una ubicación dada en el genoma de poxvirus. Por tanto, en una realización, un transgén es un gen que se ha insertado en el genoma de poxvirus en una posición dada en la que ese gen no está presente de forma natural.

[0073] En una realización, el transgén comprende un promotor de poxvirus y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño, en el que dicho promotor de poxvirus está ubicado aguas arriba de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño. Por tanto, en una realización, el vector de poxvirus comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño es cualquier secuencia de ácido nucleico enumerada anteriormente que sea adecuada para su uso en la presente invención.

[0074] En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño incluye un codón de inicio ATG ubicado en la misma posición que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto de poxvirus no esencial. Por tanto, en una realización, «misma posición» significa que el codón de inicio ATG ocupa la misma posición en el genoma de poxvirus que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto de poxvirus.

[0075] En una realización, el promotor y el marco de lectura abierto aparecen juntos en un poxvirus de tipo silvestre.

[0076] En una realización, en el contexto del vector de poxvirus, el marco de lectura abierto de poxvirus no es ninguno de los marcos de lectura abierto de MVA descritos en la patente europea EP 1689872-B1. Por tanto, en una realización, en el contexto del vector de poxvirus, el marco de lectura abierto de poxvirus no es ninguno de los siguientes marcos de lectura abierta de MVA descritos en la patente europea EP 1689872-B1: A42R (también conocido como MVA154R); J6R (MVA090R); C7L (también conocido como MVA018L); B9R (también conocido como MVA177R). Además, la patente EP 1689872-B1 también describe el marco de lectura abierto MVA «F6R»: se desconoce la existencia de este ORF y puede tratarse de un error tipográfico que hace referencia a F6L (también conocido como MVA035L) o E6R (también conocido como MVA053R). Por tanto, en una realización, en el contexto del vector de poxvirus, el marco de lectura abierto de poxvirus no es ninguno de: F6L (también conocido como MVA035L) o E6R (también conocido como MVA053R). La patente EP 1689872-B1 también describe el marco de lectura abierto de MVA «I2R» (también escrito en la patente EP 1689872-B1 como «12R»): se desconoce la existencia de este ORF y puede tratarse de un error tipográfico que hace referencia a I2L (también conocido como MVA063L). Por tanto, en una realización, en el contexto del vector de poxvirus, el marco de lectura abierto de poxvirus no es I2L (también conocido como MVA063L).

[0077] En una realización, en el contexto del vector de poxvirus, al menos parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica el marco de lectura abierto de poxvirus no esencial está presente. En una realización, «al menos parte» puede significar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos. Por tanto, en una realización, en el contexto del vector poxvirus, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en un ORF de poxvirus en el que dicho vector de poxvirus incluye (es decir, conserva) al menos parte de dicho ORF de poxvirus. Por tanto, en una realización, la secuencia de ácido nucleico está ubicada dentro del ORF de poxvirus y se elimina parte del ORF de poxvirus. Por tanto, en una realización, se retienen (es decir, siguen presentes) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos en el ORF de poxvirus no esencial.

[0078] En una realización, el vector poxvirus comprende los nucleótidos 1-25 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7, o los nucleótidos 1-25 de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-7; preferiblemente en el que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto está ubicado en una posición inmediatamente aguas abajo de dichos nucleótidos 1-25 (es decir, en las posiciones 26-28).

[0079] En una realización, el vector de poxvirus comprende los nucleótidos 1-25 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10, o los nucleótidos 1-25 de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %) de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10; preferiblemente en el que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto está ubicado en una posición inmediatamente aguas abajo de dichos nucleótidos 1-25 (es decir, en las posiciones 26-28).

[0080] Por tanto, en una realización, el vector de poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 1. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 2. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 3. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 4. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 5. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 6. En una

realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 7. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 8. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 9. En una realización, el vector poxvirus comprende la secuencia de los primeros 25 nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 10.

5 **[0081]** En una realización, en el contexto del vector poxvirus, la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño está ubicada en fase con e inmediatamente después del ATG ubicado una posición inmediatamente aguas abajo de dichos nucleótidos 1-25.

10 **[0082]** En una realización, el poxvirus del vector de poxvirus se selecciona de entre: virus vaccinia, virus vaccinia Ankara modificado (MVA), NYVAC, virus de la viruela aviar, y virus de la viruela del canario. Por tanto, en una realización, el poxvirus del vector de poxvirus es MVA. En otra realización, el poxvirus del vector de poxvirus es el virus vaccinia.

15 **[0083]** En una realización, en la que el poxvirus del vector de poxvirus es MVA, el ORF de origen natural se selecciona de entre los siguientes ORF de MVA: 176R, 041L, 027L, 157L, 052R, 005R y 168R.

20 **[0084]** En una realización, en la que el poxvirus del vector poxvirus es virus vaccinia, el ORF natural se selecciona de los siguientes ORF del virus vaccinia: B8R, F11L, K6L, A44L, E5R, C11R y B2R.

25 **[0085]** En una realización, un vector de poxvirus comprende un segundo transgén, en el que la expresión del segundo transgén es activada por un segundo promotor de poxvirus proporcionado por el poxvirus, siendo dicho segundo promotor diferente de la expresión activadora del primer transgén. En una realización, un vector poxvirus comprende transgenes adicionales además del primer y segundo transgén (por ejemplo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno, 10°, 12° o 15° transgén); la expresión de cada transgén adicional es activada por los correspondientes promotores de poxvirus adicionales proporcionados por el poxvirus (por ejemplo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno, 10°, 12° o 15° promotores de poxvirus provistos por los poxvirus).

30 **[0086]** En una realización, el segundo transgén se inserta en el genoma de poxvirus según el procedimiento de la presente invención.

35 **[0087]** En este documento se describe un procedimiento para fabricar un vector de poxvirus, que comprende proporcionar un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un vector de poxvirus (como se describió anteriormente); transfectar una célula huésped con el ácido nucleico; cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico; y obtener el vector de poxvirus a partir de la célula huésped.

40 **[0088]** El ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un vector de poxvirus (como se describió anteriormente) puede generarse mediante el uso de cualquier técnica de manipulación y generación de ácido nucleico recombinante conocido en la técnica.

45 **[0089]** Tal como se usa en este documento, «transfectar» puede significar cualquier procedimiento no viral de introducción de ácido nucleico en una célula. El ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico adecuado para transfectar una célula huésped. Por tanto, en una realización, el ácido nucleico es un plásmido. La célula huésped puede ser cualquier célula en la que pueda crecer un vector de poxvirus (como se describió anteriormente). Tal como se usa en este documento, «cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico» significa usar cualquier condición y técnica de cultivo celular conocidas en la técnica que sean adecuadas para la célula huésped elegida, y que permitan la producción del vector poxvirus en la célula huésped. Tal como se usa en el presente documento, «obtener el vector de poxvirus» significa usar cualquier técnica conocida en la técnica que sea adecuada para separar el vector de poxvirus de la célula huésped. Por tanto, en una realización, las células huésped se lisan para liberar el vector poxvirus. El vector de poxvirus puede aislarse y purificarse posteriormente usando cualquier procedimiento o procedimientos adecuados conocidos en la técnica.

55 **[0090]** En este documento, se describe una célula huésped que comprende un vector de poxvirus (como se describió anteriormente). La célula huésped puede ser cualquier célula en la que pueda crecer un vector de poxvirus (como se describió anteriormente). La célula huésped puede ser una célula de fibroblastos de embrión de pollo (CEF). La célula huésped puede ser una célula 21 de riñón de hámster bebé (BHK). La célula huésped puede ser una célula de fibroblasto de embrión de pato.

- [0091]** En este documento se describe un procedimiento para expresar en una célula diana al menos una proteína, que comprende proporcionar un vector de poxvirus (como se describió anteriormente); e introducir el vector de poxvirus en una célula diana. El procedimiento de expresión en una célula diana de al menos una proteína puede llevarse a cabo en una célula diana *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Por tanto, la célula diana puede ser parte de un cultivo celular *in vitro*, o parte de un paciente *in vivo*, o parte de un órgano o tejido *ex vivo*.
- [0092]** En este documento se describe un procedimiento *in vitro* para expresar en una célula diana al menos una proteína, que comprende proporcionar un vector de poxvirus (como se describió anteriormente); e introducir el vector de poxvirus en una célula diana. El vector de poxvirus se puede introducir en la célula diana según cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica.
- [0093]** El vector de poxvirus de la presente invención tiene múltiples utilidades, que se describen a continuación.
- [0094]** En un aspecto, la invención proporciona un vector de poxvirus (como se describió anteriormente) para uso en medicina.
- [0095]** En un aspecto, la invención proporciona un vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en terapia génica. Los procedimientos y aplicaciones de la terapia génica son conocidos en la técnica. En una realización, el vector de poxvirus es para su uso en cualquier procedimiento que tenga como objetivo evitar, tratar o curar una enfermedad o enfermedades mediante la introducción de material genético novedoso en las células de un paciente.
- [0096]** En este documento se describe un procedimiento análogo al aspecto de uso definido anteriormente, que comprende un procedimiento de terapia génica, comprendiendo dicho procedimiento de terapia génica administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de poxvirus (como se describió anteriormente).
- [0097]** En un aspecto, la invención proporciona un vector de poxvirus para su uso en el tratamiento del cáncer. En una realización, el vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento del cáncer puede comprender al menos un gen que codifica un antígeno específico de tumor (siendo dicho antígeno específico de tumor como se describió anteriormente). El antígeno específico del tumor puede visualizarse en la superficie externa de la célula tumoral o puede estar presente internamente. En una realización, se usa el vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el tratamiento comprende administrar el vector poxvirus a un paciente y estimular en el paciente una respuesta inmunogénica contra una célula o células tumorales presentes en el paciente. Por tanto, el sistema inmune del paciente puede ser estimulado para atacar un tumor presente en el paciente.
- [0098]** En una realización, el vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento del cáncer, puede comprender al menos un transgén que codifica un producto génico que tiene propiedades antitumorales o anticancerosas. A este respecto, el producto génico puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, un pequeño ARN interferente) o una proteína. El producto génico puede inhibir la proliferación y/o división de células tumorales/cancerosas. Como alternativa o además, el producto génico puede causar la muerte de células tumorales/cancerosas (por ejemplo, a través de necrosis o apoptosis).
- [0099]** En este documento se describe un procedimiento análogo al aspecto de uso definido anteriormente, que comprende un procedimiento para tratar el cáncer, comprendiendo dicho procedimiento para tratar el cáncer administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de poxvirus (como se describió anteriormente).
- [0100]** En un aspecto, la invención proporciona un vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento de la alergia. En una realización, el vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento de la alergia, puede comprender además un transgén que codifica un alérgeno. A este respecto, se puede usar el vector poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento de la alergia, en el que el tratamiento de la alergia comprende un tratamiento profiláctico para evitar el desarrollo de una alergia en un paciente, o un tratamiento terapéutico para reducir o suprimir los síntomas de una alergia en un paciente.

- 5 **[0101]** En este documento se describe un procedimiento análogo al aspecto de uso definido anteriormente, que comprende un procedimiento para tratar una alergia, comprendiendo dicho procedimiento para tratar una alergia administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de poxvirus (como se describió anteriormente).
- 10 **[0102]** En un aspecto, la invención proporciona un vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en la estimulación o inducción de una respuesta inmune en un paciente. En una realización, estimular o inducir una respuesta inmune en un paciente comprende administrar al paciente un vector de poxvirus (como se describió anteriormente).
- 15 **[0103]** En una realización, el vector poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en la estimulación o inducción de una respuesta inmune en un paciente, comprende al menos un transgén que codifica un antígeno. En una realización, el antígeno es el antígeno METRAP. En una realización, el vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en la estimulación o inducción de una respuesta inmune en un paciente, comprende al menos un transgén que codifica un adyuvante. En una realización, el vector poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en la estimulación o inducción de una respuesta inmune en un paciente, comprende un primer transgén que codifica un antígeno, y un segundo transgén que codifica un adyuvante.
- 20 **[0104]** En una realización, estimular o inducir una respuesta inmune en un paciente comprende administrar un vector de poxvirus (como se describió anteriormente) a un paciente, en la que dicho vector de poxvirus se administra sustancialmente antes, simultáneamente o después de otra composición inmunogénica.
- 25 **[0105]** En este documento se describe un procedimiento análogo al aspecto de uso definido anteriormente, que comprende un procedimiento para estimular o inducir una respuesta inmune en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento para estimular o inducir una respuesta inmune en un paciente administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de poxvirus (como se describió anteriormente).
- 30 **[0106]** En un aspecto, la invención proporciona un vector de poxvirus (como se describió anteriormente), para su uso en el tratamiento o prevención de al menos una enfermedad infecciosa. En una realización, al menos una enfermedad infecciosa se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades causadas por: *Plasmodia*, virus *influenza*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, otras micobacterias, virus de la hepatitis C, otros flavivirus, virus de la hepatitis B, virus de la inmunodeficiencia humana, otros retrovirus, *Staphylococcus aureus*, otros *Staphylococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, otros *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitides*.
- 35 **[0107]** En este documento se describe un procedimiento análogo al aspecto de uso definido anteriormente, que comprende un procedimiento para tratar o evitar al menos una enfermedad infecciosa, comprendiendo dicho procedimiento para tratar o evitar al menos una enfermedad infecciosa administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de poxvirus (como se describió anteriormente).
- 40 **[0108]** En una realización, el tratamiento o prevención de al menos una enfermedad infecciosa comprende administrar a un paciente un vector de poxvirus (como se describió anteriormente) en la que dicho vector de poxvirus se administra sustancialmente antes, simultáneamente o después de otra composición inmunogénica.
- 45 **[0109]** Los regímenes de administración anterior, simultánea y secuencial se tratan con más detalle a continuación.
- 50 **[0110]** El vector de poxvirus de la presente invención puede ser útil para inducir un intervalo de respuestas inmunes y, por lo tanto, puede ser útil en procedimientos para tratar una gama de enfermedades.
- [0111]** Tal como se usa en este documento, el término «tratamiento» o «tratar» abarca medidas terapéuticas o preventivas/profilácticas, e incluye terapia postinfección y mejora de una enfermedad infecciosa.
- [0112]** Tal como se usa en este documento, el término «evitar» incluye evitar el inicio de una enfermedad infecciosa y/o reducir la gravedad o intensidad de una enfermedad infecciosa.
- [0113]** Un vector de poxvirus de la invención (como se describió anteriormente) se puede administrar a un paciente (típicamente un paciente mamífero, tal como un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino o felino) que ya tiene una enfermedad infecciosa, para tratar o evitar dicha enfermedad infecciosa. En

una realización, se sospecha que el paciente ha estado en contacto con una enfermedad infecciosa (o el agente causante de la enfermedad), o ha tenido contacto conocido con una enfermedad infecciosa (o el agente causante de la enfermedad), pero todavía no muestra síntomas de la exposición a dicha enfermedad infecciosa (o dicho agente causante de la enfermedad).

5

[0114] Cuando se administra a un paciente (*p. ej.*, un mamífero, como un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino o felino) que ya tiene una enfermedad infecciosa, o muestra síntomas asociados con una enfermedad infecciosa, un vector de poxvirus de la invención (como se describió anteriormente) puede curar, retrasar, reducir la gravedad, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad infecciosa; y/o prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

10

[0115] Como alternativa, un vector de poxvirus de la invención (como se describió anteriormente) puede administrarse a un paciente (*p. ej.*, un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino o felino) que en última instancia puede contraer una enfermedad infecciosa, con el fin de evitar, curar, retrasar, reducir la gravedad, o mejorar uno o más síntomas, de dicha enfermedad infecciosa; o con el fin de prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

15

[0116] En una realización, el paciente ha sido expuesto previamente a una enfermedad infecciosa. Por ejemplo, el paciente puede haber tenido una enfermedad infecciosa en el pasado (pero opcionalmente no está actualmente infectado con el agente causante de la enfermedad infecciosa). El paciente puede estar latentemente infectado con una enfermedad infecciosa. Como alternativa, o además, el paciente puede haber sido vacunado contra dicha enfermedad infecciosa en el pasado.

20

[0117] Los tratamientos y las terapias preventivas en las que pueden usarse vectores de poxvirus de la presente invención son aplicables a una diversidad de pacientes diferentes de diferentes edades. En el contexto de los seres humanos, las terapias son aplicables a los niños (*p. ej.*, bebés, niños menores de 5 años, niños mayores o adolescentes) y adultos. En el contexto de otros pacientes animales (*p. ej.*, mamíferos tales como pacientes bovinos, porcinos o equinos), las terapias son aplicables a pacientes inmaduros (*p. ej.*, terneros, lechones, potros) y pacientes maduros/adultos. Los tratamientos y terapias preventivas de la presente invención son aplicables a pacientes que están inmunocomprometidos o inmunosuprimidos (*p. ej.*, pacientes humanos que tienen VIH o SIDA, u otros pacientes animales con enfermedades de inmunodeficiencia comparables), pacientes que se han sometido a un trasplante de órgano, trasplante de médula ósea o quienes tienen inmunodeficiencias genéticas.

25

30

[0118] Los vectores de poxvirus de la invención (como se describió anteriormente) se pueden emplear como vacunas.

35

[0119] Tal como se usa en este documento, una «vacuna» es una formulación que, cuando se administra a un paciente animal tal como un mamífero (*p. ej.*, un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino o felino) estimula una respuesta inmune protectora contra una enfermedad infecciosa. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune humoral y/o mediada por células. Por tanto, la vacuna puede estimular células B y/o células T. Una vacuna de la invención se puede usar, por ejemplo, para proteger a un animal de los efectos de una enfermedad infecciosa (por ejemplo, malaria, gripe, VIH o tuberculosis).

40

[0120] El término «vacuna» se usa en este documento de forma intercambiable con la expresión «composición terapéutica/profiláctica», el término «formulación», la expresión «composición antigénica», o el término «medicamento».

45

[0121] En un aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende un vector de poxvirus (como se describió anteriormente); y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50

[0122] La vacuna de la invención (como se definió anteriormente), además de un vehículo farmacéuticamente aceptable, se puede combinar también con uno o más de una sal, excipiente, diluyente, adyuvante, agente inmunorregulador y/o compuesto antimicrobiano.

55

[0123] En un aspecto, la invención proporciona una composición inmunológica que comprende un vector de poxvirus (como se describió anteriormente); y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0124] La composición inmunológica además de un vehículo farmacéuticamente aceptable se puede combinar también con uno o más de una sal, excipiente, diluyente, adyuvante, agente inmunorregulador y/o compuesto antimicrobiano.

5 **[0125]** En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de poxvirus (como se describió anteriormente); y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0126] La composición farmacéutica además de un vehículo farmacéuticamente aceptable se puede combinar también con uno o más de una sal, excipiente, diluyente, adyuvante, agente inmunorregulador y/o compuesto antimicrobiano.

[0127] El vector de poxvirus se puede formular en una vacuna, composición inmunogénica o composición farmacéutica como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, maleico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

[0128] La administración de composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) se realiza generalmente por vías convencionales, *p. ej.*, vías intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o mucosa. La administración puede ser por administración parenteral; por ejemplo, una inyección subcutánea o intramuscular.

[0129] En consecuencia, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención se pueden preparar como inyectables, bien soluciones líquidas o como suspensiones. Como alternativa, se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o el péptido puede encapsularse en liposomas o microcápsulas.

[0130] Los principios activos a menudo se mezclan con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, y/o agentes tamponantes del pH. La vacuna y las composiciones inmunológicas de la presente invención pueden comprender adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna o la composición inmunológica.

[0131] Generalmente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, solución salina y solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones, sin embargo, la composición está en forma liofilizada, en cuyo caso puede incluir un estabilizador, tal como albúmina de suero bovino (ASB). En algunas realizaciones, puede ser deseable formular la composición con un conservante, tal como tiomersal o azida de sodio, para facilitar el almacenamiento a largo plazo.

[0132] Ejemplos de adyuvantes adicionales que pueden ser eficaces incluyen, pero sin limitación: adyuvante de Freund completo (AFC), adyuvante de Freund incompleto (AFI), saponina, una fracción de extracto purificado de saponina tal como Quil A, un derivado de saponina tal como QS- 21, partículas de lípidos basadas en Saponina tales como ISCOM/ISCOMATIX, mutantes de toxina termolábil (LT) de *E. coli* tales como LTK63 y/o LTK72, hidróxido de aluminio, *N*-acetil-muramil-*L*-treonil-*D*-isoglutamina (thr-MDP), *N*-acetil-nor-muramil-*L*-alanil-*D*-isoglutamina (CGP 11637, denominada nor-MDP), *N*-acetilmuramil-*L*-alanil-*D*-isoglutaminil-*L*-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisfosforil oxi)-etilamina (CGP 19835A, denominada MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + EPC) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %.

[0133] En una realización, el adyuvante puede incluir un componente adicional, un segundo antígeno, que puede ser el mismo o diferente del primer antígeno, por ejemplo, una hemaglutinina de la gripe o cualquiera de los antígenos descritos anteriormente, proporcionados como adecuados para su uso en la presente invención.

[0134] Ejemplos de agentes tamponantes incluyen, pero sin limitación, succinato de sodio (pH 6,5) y solución salina tamponada con fosfato (STF, pH 6,5 y 7,5).

- [0135]** Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales o formulaciones adecuadas para la distribución en forma de aerosoles. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, 5 polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5 % a 10 %, preferiblemente 1 %-2 %.
- [0136]** Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, 10 calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos.
- [0137]** Se puede desear dirigir los vectores de poxvirus de la presente invención (como se describió 15 anteriormente) al sistema respiratorio de un paciente; por ejemplo, para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad respiratoria, o para dirigir una terapia génica al sistema respiratorio (como a los pulmones). La transmisión eficaz de una composición terapéutica/profiláctica o medicamento al sitio de infección en los pulmones se puede conseguir mediante la administración oral o intranasal.
- [0138]** Las formulaciones para la administración intranasal pueden estar en forma de gotitas nasales o un 20 aerosol nasal. Una formulación intranasal puede comprender gotitas que tienen diámetros aproximados en el intervalo de 100-5000 μm , tales como 500-4000 μm , 1000-3000 μm o 100-1000 μm . Como alternativa, en términos de volumen, las gotitas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,001-100 μl , tal como 0,1-50 μl o 1,0-25 μl , o tal como 0,001-1 μl .
- [0139]** Como alternativa, la formulación terapéutica/profiláctica o medicamento puede ser una formulación en 25 aerosol. La formulación en aerosol puede tomar la forma de un polvo, suspensión o solución. El tamaño de las partículas de aerosol es relevante para la capacidad de entrega de un aerosol. Las partículas más pequeñas pueden desplazarse más abajo de la vía respiratoria hacia los alvéolos que las partículas más grandes. En una realización, las partículas de aerosol tienen una distribución de diámetro para facilitar la entrega a lo largo de toda la longitud de 30 los bronquios, bronquiolos y alvéolos. Como alternativa, la distribución del tamaño de partícula puede seleccionarse para dirigirse a una sección particular de la vía respiratoria, por ejemplo, los alvéolos. En el caso de la entrega en aerosol del medicamento, las partículas pueden tener diámetros en el intervalo aproximado de 0,1-50 μm , preferiblemente 1-25 μm , más preferiblemente 1-5 μm .
- [0140]** Las partículas de aerosol pueden ser entregadas usando un nebulizador (*p. ej.*, a través de la boca) o 35 un aerosol nasal. Una formulación en aerosol puede contener opcionalmente un propulsor y/o tensioactivo.
- [0141]** Al controlar el tamaño de las gotitas/partículas dentro del intervalo definido de la presente invención, es 40 posible evitar (o minimizar) la entrega inadvertida de medicamentos a los alvéolos y así evitar problemas patológicos asociados a los alvéolos tales como la inflamación y la cicatrización fibrótica de los pulmones.
- [0142]** La vacunación intranasal involucra mecanismos efectores mediados por células T y B en tejidos 45 mucosales nasales y bronquiales, que difieren de otros tejidos linfoides asociados a la mucosa. Los mecanismos de protección recurridos por la vía de administración intranasal pueden incluir: la activación de los linfocitos T con la migración dirigida pulmonar preferencial; la regulación positiva de moléculas coestimuladoras (*p. ej.*, B7.2); y/o la activación de macrófagos o anticuerpos secretores de IgA.
- [0143]** La entrega intranasal de vectores de poxvirus de la invención (como se describió anteriormente) puede 50 facilitar la invocación de una respuesta de anticuerpos mucosales, que se ve favorecida por un cambio en la respuesta de células T hacia el fenotipo Th2 que ayuda a la producción de anticuerpos. Una respuesta de la mucosa se caracteriza por una producción de IgA potenciada, y una respuesta Th2 se caracteriza por una producción potenciada de IL-4.
- [0144]** En una realización, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, 55 composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente uno o más de una sal, excipiente, diluyente y/o adyuvante.
- [0145]** En una realización, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención pueden comprender uno

o más agentes inmunorreguladores seleccionados de entre, por ejemplo, inmunoglobulinas, antibióticos, interleucinas (*p. ej.*, IL-2, IL-12) y/o citocinas (*p. ej.*, IFN γ).

5 **[0146]** En una realización, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención pueden comprender uno o más compuestos antimicrobianos (por ejemplo, fármacos antituberculosis convencionales, tales como rifampicina, isoniacida, etambutol o pirizinaida).

10 **[0147]** Las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención pueden administrarse en un programa de dosis única (*es decir*, la dosis completa se administra sustancialmente una vez). Como alternativa, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención pueden administrarse en un programa de dosis múltiples.

15 **[0148]** Un programa de dosis múltiples es aquel en el que un ciclo de tratamiento primario (*p. ej.*, vacunación) puede ser con 1-6 dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores requeridos para mantener y o reforzar la respuesta inmune, por ejemplo (para pacientes humanos), en 1-4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una(s) dosis posterior(es) después de 1-4 meses adicionales.

20 **[0149]** La pauta posológica se determinará, al menos en parte, según la necesidad del individuo y dependerá del juicio del facultativo (por ejemplo, médico o veterinario).

[0150] La administración simultánea significa la administración en (sustancialmente) el mismo tiempo.

25 **[0151]** La administración secuencial de dos o más composiciones/agentes terapéuticos/vacunas significa que las composiciones/agentes terapéuticos/vacunas se administran en (sustancialmente) tiempos diferentes, uno después del otro.

30 **[0152]** Por ejemplo, en una realización, la vacuna de la presente invención se puede administrar como parte de un régimen de vacunación «inducción-refuerzo».

[0153] En una realización, la vacuna de la presente invención se administra como el «refuerzo» en un régimen de «inducción-refuerzo».

35 **[0154]** En una realización, la vacuna de la presente invención se administra como la «inducción» en un régimen de «inducción-refuerzo».

40 **[0155]** En una realización, un régimen de «inducción-refuerzo» comprende además la administración de una vacuna que no es una vacuna de la presente invención.

[0156] En una realización, un régimen de «inducción-refuerzo» comprende una inducción de vector de adenovirus.

45 **[0157]** En una realización, dicho vector de adenovirus comprende AdCh63.

[0158] En una realización, un régimen de «inducción-refuerzo» comprende una «inducción» de vector de adenovirus AdCh63.

50 **[0159]** En una realización, una vacuna de la presente invención usada como un «refuerzo» en un régimen de «inducción-refuerzo» comprende un vector MVA que comprende un primer y segundo transgenes, en la que dichos transgenes son diferentes, y en la que dichos transgenes son activados por el primer y segundo promotores, en la que dichos promotores son diferentes.

[0160] En una realización, se administra una «inducción» de adenovirus, seguido de un «refuerzo» de MVA en la que el MVA es un vector según la presente invención, y en la que dicho vector MVA comprende un primer y segundo transgenes, en la que dichos transgenes son diferentes, y en la que dichos transgenes son activados por un primer y un segundo promotores, en la que dichos promotores son diferentes.

[0161] En una realización, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención pueden administrarse a un paciente tal como un mamífero (*p. ej.*, un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino o felino) conjuntamente (simultánea o secuencialmente) con uno o más agentes inmunorreguladores seleccionados de 5 entre, por ejemplo, inmunoglobulinas, antibióticos, interleucinas (*p. ej.*, IL-2, IL-12) y/o citocinas (*p. ej.*, IFN γ).

[0162] En una realización, las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas, y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) de la invención se pueden administrar a un paciente tal como un mamífero (*p. ej.* un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino 10 o felino) conjuntamente (simultánea o secuencialmente) con uno o más compuestos antimicrobianos, tales como fármacos antituberculosis convencionales (*p. ej.*, rifampicina, isoniazida, etambutol o pirizinaamida).

[0163] Las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas, y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) pueden contener de 5 % a 95 % de principio activo, tal 15 como al menos 10 % o 25 % de principio activo, o al menos 40 % de principio activo o al menos 50, 55, 60, 70 o 75 % de principio activo.

[0164] Las composiciones inmunogénicas, formulaciones terapéuticas, medicamentos, composiciones farmacéuticas y formulaciones profilácticas (*p. ej.*, vacunas) se administran de una manera compatible con la 20 formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz.

[0165] A este respecto, tal como se usa en este documento, una «cantidad eficaz» es una dosificación o cantidad que es suficiente para conseguir un resultado biológico deseado. Tal como se usa en este documento, una «cantidad terapéuticamente eficaz» es una cantidad que es eficaz tras la administración de dosis únicas o múltiples a 25 un paciente (como un mamífero, *p. ej.*, un paciente humano, bovino, porcino, ovino, caprino, equino, cervino, canino o felino) para tratar, evitar, curar, retrasar, reducir la gravedad, mejorar al menos un síntoma de un trastorno o trastorno recurrente, o prolongar la supervivencia del paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

[0166] En consecuencia, la cantidad de principio activo a administrar depende del paciente a tratar, la 30 capacidad del sistema inmune del paciente para generar una respuesta inmune protectora, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de principio activo requeridas a administrar pueden depender del juicio del facultativo y pueden ser particulares para cada paciente.

[0167] Tal como se usa en este documento, la expresión «secuencia de ácido nucleico» y el término 35 «polinucleótido» se usan de manera intercambiable y no implican ninguna restricción de longitud. Tal como se usa en este documento, los términos «ácido nucleico» y «nucleótido» se usan de manera intercambiable. La expresión «secuencia de ácido nucleico» y el término «polinucleótido» abarcan ADN (incluido ADNc) y secuencias de ARN.

[0168] Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención incluyen secuencias de ácidos nucleicos 40 que se han eliminado de su entorno de origen natural, aislados de ADN recombinantes o clonados, y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos.

[0169] Los polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse grandes cantidades de los polinucleótidos por replicación en una célula 45 huésped adecuada. Los fragmentos de ADN naturales o sintéticos que codifican para un fragmento deseado se incorporarán en construcciones de ácido nucleico recombinante, típicamente construcciones de ADN, capaces de la introducción y replicación en una célula procariota o eucariota. Generalmente, las construcciones de ADN serán adecuadas para la replicación autónoma en un huésped unicelular, tal como levadura o bacteria, pero también pueden estar destinados a la introducción e integración dentro del genoma de un cultivo de insecto, mamífero, planta u otras 50 líneas celulares eucariotas.

[0170] Los polinucleótidos de la presente invención también se pueden producir mediante síntesis química, *p. ej.*, mediante el procedimiento de la fosforamida o el procedimiento del triéster, y se pueden realizar en sintetizadores de oligonucleótidos automáticos comerciales. Se puede obtener un fragmento bicatenario a partir del producto 55 monocatenario de síntesis química bien sintetizando la cadena complementaria e hibridando la cadena en condiciones adecuadas, o bien añadiendo la cadena complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebador adecuada.

[0171] Cuando se aplica a una secuencia de ácido nucleico, el término «aislado» en el contexto de la presente invención indica que la secuencia de polinucleótidos se ha eliminado de su entorno genético natural y, por tanto, está libre de otras secuencias codificantes externas o no deseadas (pero puede incluir regiones 5' y 3' no traducidas de origen natural tales como promotores y terminadores), y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas diseñados por ingeniería genética. Dichas moléculas aisladas son aquellas que están separadas de su entorno natural.

[0172] En vista de la degeneración del código genético, es posible una considerable variación de secuencia entre los polinucleótidos de la presente invención. Los codones degenerados que abarcan todos los codones posibles para un aminoácido dado se exponen a continuación:

	Aminoácido	Codones	Codón degenerado
	Cys	TGC TGT	TGY
	Ser	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
15	Thr	ACA ACC ACG ACT	ACN
	Pro	CCA CCC CCG CCT	CCN
	Ala	GCA GCC GCG GCT	GCN
	Gly	GGA GGC GGG GGT	GGN
	Asn	AAC AAT	AAY
20	Asp	GAC GAT	GAY
	Glu	GAA GAG	GAR
	Gln	CAA CAG	CAR
	His	CAC CAT	CAY
	Arg	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
25	Lys	AAA AAG	AAR
	Met	ATG	ATG
	Lle	ATA ATC ATT	ATH
	Leu	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
	Val	GTA GTC GTG GTT	GTN
30	Phe	TTC TTT	TTY
	Tyr	TAC TAT	TAY
	Trp	TGG	TGG
	Ter	TAA TAG TGA	TRR
	Asn/Asp		RAY
35	Glu/Gln		SAR
	Cualquiera		NNN

[0173] Un experto en la técnica apreciará que existe flexibilidad cuando se determina un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de la presente invención.

[0174] Una secuencia de ácido nucleico «variante» tiene una homología sustancial o una similitud sustancial con una secuencia de ácido nucleico de referencia (o un fragmento de la misma). Una secuencia de ácido nucleico o fragmento de la misma es «sustancialmente homóloga» (o «sustancialmente idéntica») a una secuencia de referencia si, cuando está óptimamente alineada (con inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas) con el otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98 o 99 % de las bases de nucleótidos. Los procedimientos para la determinación de homología de secuencias de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica.

[0175] Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico «variante» es sustancialmente homóloga (o sustancialmente idéntica) con una secuencia de referencia (o un fragmento de la misma) si la «variante» y la secuencia de referencia son capaces de hibridarse en condiciones de hibridación rigurosa (*p. ej.*, altamente rigurosa). La hibridación de secuencias de ácido nucleico se verá afectada por condiciones tales como concentración de sal (*p. ej.* NaCl), temperatura o disolventes orgánicos, además de la composición de base, la longitud de las cadenas complementarias y el número de desapareamientos de bases de nucleótidos entre los ácidos nucleicos hibridantes como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Se emplean preferiblemente condiciones de temperatura rigurosas, y generalmente incluyen temperaturas en exceso de 30 °C, típicamente en exceso de 37 °C y

preferiblemente en exceso de 45 °C. Las condiciones rigurosas de sal serán habitualmente menores de 1000 mM, típicamente menos de 500 mM, y preferiblemente menores de 200 mM. El pH es típicamente entre 7,0 y 8,3. La combinación de parámetros es mucho más importante que cualquier parámetro individual.

- 5 **[0176]** Un experto en la técnica aprecia que las diferentes especies muestren «uso de codones preferenciales». Tal como se usa en este documento, la expresión «uso de codones preferenciales» se refiere a codones que se usan con mayor frecuencia en células de una determinada especie, favoreciendo así a uno o unos pocos representantes de los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede estar codificado por ACA, ACC, ACG o ACT, pero en células huésped de mamífero, ACC es el codón de uso más común;
- 10 en otras especies, diferentes codones Thr pueden ser preferenciales. Los codones preferenciales para una especie de célula huésped particular se pueden introducir en los polinucleótidos de la presente invención mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferenciales en ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo que la traducción de proteínas sea más eficaz en un tipo o especie de célula particular.
- 15 **[0177]** Por tanto, en una realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico se optimiza con codones para la expresión en una célula huésped. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico se optimiza para el uso del codón poxviral.
- 20 **[0178]** Un «fragmento» de un polinucleótido de interés comprende una serie de nucleótidos consecutivos a partir de la secuencia de dicho polinucleótido de longitud completa. A modo de ejemplo, un «fragmento» de un polinucleótido de interés puede comprender (o consistir en) al menos 24 nucleótidos consecutivos a partir de la secuencia de dicho polinucleótido (*p. ej.*, al menos 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 restos de ácido nucleico consecutivos de dicho polinucleótido). Un
- 25 fragmento puede incluir al menos un determinante antigénico y/o puede codificar al menos un epítipo antigénico del polipéptido correspondiente de interés.

Lista de figuras:

- 30 **[0179]**
- Figura 1:
Niveles de expresión de tPA-Pb9-Lucr8PV en sobrenadantes de cultivo de células BHK 24 h después de la infección con MVA recombinantes a 1 upf por célula en presencia o ausencia de AraC.
- 35 Figura 2:
Respuestas de células T CD8+ provocadas por vacunación con MVA recombinantes medidas mediante ensayo ELISpot. CFM = células formadoras de manchas.
- 40 Figura 3:
Inmunogenicidad en ratones inmunizados con MVAR-BAC después de MVA de disparo único. Consulte la Tabla 1 para convertir esta nomenclatura en la nomenclatura BGXX.
- Figura 4:
45 (PARTE SUPERIOR) Las respuestas celulares esplénicas de CD8+IFN γ + específicas de Pb9 se midieron 2 semanas después del refuerzo (día 70) mediante ELISPOT.
(PARTE INFERIOR) Respuestas de anticuerpos a Lucr evaluadas por ELISA.
Consulte la Tabla 1 para convertir esta nomenclatura en la nomenclatura BGXX.
- 50 Figura 5a-b:
Niveles de expresión de tPA-Pb9-Lucr8PV en sobrenadantes de cultivo de células BHK en diferentes momentos después de la infección con los MVA recombinantes indicados y 24 horas después de la infección en el lisado celular (la leyenda de la figura se aplica tanto a la Figura 5a como a la Figura 5b).
- 55 Figura 6:
Datos relacionados con la estabilidad genética, como se presenta en el Ejemplo 4.
- Figura 7:
Datos relacionados con el promotor *E3L*, como se presenta en el Ejemplo 5.

Figura 8:

Régimen de vacunación: todos los ratones se indujeron por vía intramuscular con Adenovirus-Photinus + Adenovirus-Pb9-1e7ifu cada uno y se reforzaron por vía intramuscular 14 semanas después con los siguientes virus MVA:

5

- 1) B8R-Photinus + vector vacío MVA-BAC - 10e6 upf/ratón cada uno proporcionado por separado
- 2) C11R-Pb9Lucr + vector vacío MVA-BAC - 10e6 upf/ratón cada uno proporcionado por separado
- 3) MVA-BAC-B8R-Photinus + MVA-BAC-C11R-Pb9Lucr - 10e6 upf/ratón, cada uno proporcionado por separado
- 4) Doble MVA-B8R-Photinus-C11R-Pb9Lucr - 10e6 upf/ratón

10

El ensayo ELISpot se realizó con PBMC de ratón

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1

Procedimientos

[0180] Los investigadores seleccionaron siete genes de MVA para demostrar la prueba de concepto (Tablas 1 y 2) mediante el uso de los promotores que se supone están presentes aguas arriba de los ORF para activar la expresión de un transgén insertado en los loci auténticos de los promotores.

Tabla 1: genes seleccionados para el estudio de prueba de concepto

Seq ID	ORF de MVA	Ortólogo de vaccinia	Notas
BG02	176R	B8R	Truncamiento por inactivación de 3' en MVA
BG03	041L	F11L	Fragmentado en MVA (041L + 040L) (www.poxvirus.org)
BG04	027L	K6L	Fragmentado en vaccinia (K5L + K6L) y MVA (026L + 027L) en comparación con otros poxvirus (www.poxvirus.org)
BG05	157L	A44L	No afecta el crecimiento o la inmunogenicidad en MVA; tampoco es esencial en vaccinia
BG06	052R	E5R	Polimórfico entre las cepas de vaccinia (www.poxvirus.org). Posible componente de virosomas
BG07	005R	C11R	No es esencial en MVA; no es esencial en vaccinia
BG08	168R	B2R	Fragmentado en MVA (168R a 170R) y en vaccinia (B2R + B3R) en comparación con otros poxvirus (www.poxvirus.org)

25

Tabla 2: secuencias y posiciones de sitios de inserción de genes seleccionados

Seq ID	Secuencia de 25 pb en cualquier sitio del codón de inicio utilizado (en mayúscula). La cursiva indica que la secuencia de codificación debe reemplazarse por la del transgén	Posición de A del ATG indicado en el Gen Bank U94848§
BG02	<i>cagtagtcaaataacaacacacc</i> ATGagatataattataattctcgagttt	157621 (cadena superior)
BG03	<i>tattttatcgttggtgta</i> *cactAGgggtttgcattccattgagatcaa	33771 (cadena inferior)
BG04	<i>gcaaactgtatgttcaatctggaca</i> ATGattacatacctaaggcattagat	24694 (cadena inferior)
BG05	<i>tagtctgatattagtgagtgagca</i> ATGgcatgtacgcggttactggtggtg	15377 (cadena inferior)
BG06	<i>ttgatattaacaaaagtgaatata</i> ATGtaataattgtattggttatacg	44810 (cadena superior)
BG07	<i>agcataaacacaaaatccatcaaaa</i> ATGttgataaattatctgatgtgtgt	10203 (cadena superior)
BG08	<i>ctcgggtgggtacgacgagaatcttc</i> ATGcctttcctggaatatcatcgacgt	152144 (cadena superior)

* Esta A en la posición -5 de F11L es una mutación particular de MVA, y se cambió a T durante la construcción para hacer que el promotor sea idéntico a la secuencia del virus vaccinia, con el objetivo de mejorar la expresión. Esto supone que la mutación tiene un efecto negativo sobre la expresión, pero no existen datos comparativos.
 § [Antoine, G, y col., Virology, 1998. 244(2): págs. 365-96]

[0181] Usando ingeniería genética mediada por recombinación de un clon de cromosoma artificial bacteriano del genoma de MVA con selección de GalK, como se describe en Cottingham, MG, y col., PLoS ONE, 2008. 3 (2): pág. e1638.

[0182] Los investigadores insertaron un transgén que codifica un antígeno modelo, tPA-Pb9-Lucr8PV (descrito a continuación), en estos loci de inserción, de modo que el promotor endógeno que supuestamente estaba aguas arriba del gen seleccionado activó la expresión del transgén en lugar del gen endógeno. En otras palabras, el ATG en mayúscula en la Tabla 2 era ahora el codón iniciador del transgén en lugar del gen viral. La posición del extremo 5' de la inserción transgénica se fija por lo tanto en este ATG, pero la del extremo 3' puede variar: en los ejemplos descritos, los genes virales dirigidos se eliminaron además parcial o totalmente. Los factores que afectan la elección de la región eliminada incluyen la eliminación de una secuencia inútil (que potencialmente codifica proteínas sin sentido o truncadas) que ahora se transcribe a un nivel muy reducido o no se transcribe en absoluto, equilibrada contra la retención de secuencias reguladoras supuestas que pueden solaparse con el ORF inactivado (*p. ej.*, promotores, terminadores T5NT).

[0183] Con el fin de facilitar la medición de los niveles de expresión transgénica y la inmunogenicidad, los investigadores diseñaron la proteína indicadora tPA-Pb9-Lucr8PV. Esto tiene una secuencia secretora señal del activador del plasminógeno tisular (tPA) fusionado a un epítipo de células T CD8+ murinas restringidas a H-2K^d de proteína circumsporozoito de *plasmodium berghei* (pb9) [Romero, P., *y col.*, Immunol Lett, 1990. 25 (1-3): págs. 27-31], fusionado a *Renilla reniformis* luciferasa (Lucr) que contiene 8 mutaciones puntuales que mejoran la estabilidad de la proteína y la actividad tras la secreción [Loening, AM, *y col.*, Protein Eng Des Sel, 2006. 19 (9): págs. 391-400] y una mutación silenciosa para eliminar una secuencia del terminador poxviral (T5NT) (8PV). La proteína indicadora se secreta en el medio de cultivo celular de células infectadas con virus recombinantes que expresan tPA-Pb9-Lucr8PV y puede cuantificarse usando un ensayo luminométrico convencional para *renilla* luciferasa *in vitro* así como también mediante formación de imágenes *in vivo*. Las células TCD8+ específicas de péptidos Pb9 en ratones BALB/c inmunizados se pueden enumerar usando ensayos de ELIspot de IFN- γ convencionales o tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo. Por tanto, colocando esta construcción aguas abajo de los loci de inserción activados por promotores endógenos candidatos (EPDILs) BG02 a BG08 (Tabla 1), los investigadores podrían evaluar sus características y utilidad.

Resultados

[0184] El MVA recombinante que portaba tPA-Pb9-Lucr8PV en los siete EPDILs BG02 a BG08 se aisló con éxito, se verificó su identidad y clonalidad, se amplificó a granel, se purificó por ultracentrifugación en colchón de sacarosa y se tituló por procedimientos convencionales. Los rendimientos purificados de los seis virus pertenecían al intervalo típicamente alcanzado en el laboratorio de los investigadores y fueron muy similares entre sí (entre 1,8 y 5,4 x 10⁹ ufp/ml): aunque los investigadores aún tienen que realizar análisis formales de rendimiento, productividad y velocidad de crecimiento, esto es muy indicativo de la propagación normal *in vitro*. Para fines comparativos, se incluyeron dos recombinantes convencionales, uno con p7.5 y uno con SSP que activa tPA-Pb9-Lucr8PV, más un control negativo que carece del transgén (títulos 4,5 y 4,7 x 10⁹ ufp/ml). Resultó más difícil obtener una preparación clonal del virus BG06-EPDIL que los otros recombinantes, posiblemente (pero no necesariamente) lo que indica un efecto adverso de la eliminación de *E5R*. La función de este gen es en gran parte no caracterizada, pero se ha indicado que la proteína E5 se localiza en virosomas tempranos después de la infección.

[0185] La actividad luciferasa se ensayó 24 horas después de la infección con los MVA recombinantes en presencia y ausencia de arabinósido de citosina (AraC), un análogo de nucleósido que bloquea la replicación del ADN viral y por lo tanto inhibe la expresión génica poxviral intermedia y tardía (Figura 1). Por tanto, en ausencia de AraC, la expresión observada podría proceder de la transcripción temprana, intermedia o tardía, pero en presencia de AraC, solo la transcripción temprana (prerreplicativa) es responsable. Todos los virus también expresaban un indicador de proteína fluorescente verde (GFP) independiente para permitir que la igualdad de infección se verificara mediante fluorimetría (datos no mostrados), asegurando así que las diferencias surgen de los promotores en lugar de simplemente una titulación y dilución virales inexactas.

[0186] En ausencia de AraC, el promotor sintético altamente activo SSP produjo la mayor actividad de luciferasa, como se esperaba. Ninguno de los sitios de inserción activados por el promotor endógeno novedoso se acercó a este nivel, pero tres fueron comparables con la actividad más modesta del promotor p7.5 de uso común. Cuando se trató con AraC, la actividad temprana de algunos de los promotores novedosos incluso excedió la de SSP. En ambas condiciones, BG04 mostró una expresión muy pobre. Estos resultados indican que, con la excepción de BG04, todos los promotores EPDIL tienen actividad temprana comparable o mejor que ambos promotores canónicos, y actividad global (temprana + intermedia + tardía) comparable o algo menor que p7.5.

Estudios de inmunogenicidad murina

[0187] Se llevó a cabo un primer experimento, comparando los MVA recombinantes BG02, BG04 y BG05 EPDIL con los recombinantes convencionales activados por p7.5 y SSP. Se inmunizaron ratones BALB/c por vía intradérmica con 10^6 ufp de cada virus y las respuestas de células T específicas de péptido pb9 fueron analizadas en 5 esplenocitos por ensayo ELISpot dos semanas después de la vacunación. Como control, se midieron las respuestas de las células TCD8+ al antígeno viral inmunodominante codificado por *F2L* usando el péptido F2(G) [Tschärke, DC, y col., J Virol, 2006. 80 (13): págs. 6318-23] (Figura 2).

[0188] Como se esperaba, los cinco virus probados provocaron respuestas de células T CD8+ iguales al péptido antigénico viral F2(G) ($p = 0,9$ por ANOVA), pero se observaron diferencias estadísticamente significativas en las respuestas al epítipo Pb9 codificado por el transgén, cuya expresión fue activada por un promotor diferente en cada virus ($p < 0,0001$ por ANOVA). Sorprendentemente, tanto los recombinantes BG02 como BG05 EPDIL provocaron respuestas de células TCD8+ específicas de pb9 más elevadas incluso que la SSP altamente activa, estadísticamente significativa en el caso de BG02 ($p < 0,05$ por la prueba post hoc de Newman-keuls). El recombinante BG04 EPDIL 15 provocó una respuesta de células TCD8+ específica de pb9 muy baja pero no nula. Dado que las respuestas F2(G) fueron equivalentes, estas diferencias no pueden atribuirse a la desigualdad de la dosis, por lo tanto son indicativas de un efecto dependiente del promotor sobre la inmunogenicidad de las células TCD8+ transgénicas.

[0189] Se llevó a cabo un segundo experimento, que se expande en el primer experimento de inmunogenicidad murino descrito anteriormente. Cada grupo de ratones ($n = 4$) se inmunizó (im) con 106 ufp/ratón de MVAR-BAC en el día 0 y los bazo se recogieron 1 semana (día 7) después de la inmunización. Las respuestas celulares CD8+ IFN γ + esplénicas específicas de Pb9 se midieron mediante (A) tinción de citocinas intracelulares (ICS) y citometría de flujo (B) ELISPOT (Figura 3 - la nomenclatura en la Figura 3 se puede convertir en la nomenclatura BGXX con referencia a la Tabla 1).

25

Ejemplo 2

Inmunogenicidad como parte del régimen de inducción-refuerzo de Adch-MVA

[0190] Régimen de vacunación inducción-refuerzo para probar la inmunogenicidad de MVAR-BAC: cada grupo 30 de ratones ($n = 4$) fue inmunizado (im) con adenovirus de chimpancé 63 (AdCh63) a 108 ufi/ratón en el día 0 y reforzado 8 semanas después con MVAR- BACs. Todos los virus expresaron antígeno modelo, Pb9-Lucr8 (Figura 4).

[0191] Esto demuestra la utilidad de estos promotores cuando el MVA se usa como vacuna de refuerzo.

35

Ejemplo 3

Cinética de la expresión del gen indicador en células *in vitro*

[0192] Los niveles de expresión de tPA-Pb9-Lucr8PV en sobrenadantes de cultivo de células BHK se midieron 40 en diferentes momentos después de la infección con los MVA recombinantes indicados y 24 horas después de la infección en el lisado celular (Figura 5).

[0193] Los datos obtenidos complementan los que se muestran en la Figura 1 e indican que, además de los 45 niveles a las 24 horas después de la infección, la cinética de expresión génica desde los loci de inserción activados por el promotor endógeno novedoso también es equivalente.

Ejemplo 4

Estabilidad genética

50

[0194] Los virus recombinantes se sometieron a cinco pases en serie en células BHK, después de lo cual no se observó diferencia en la expresión de la luciferasa en las células infectadas con el inóculo de pase 1 o pase 5. Esto indica que el transgén se ha mantenido estable integrado en los cinco de los loci de inserción activados por el promotor endógeno novedoso (Figura 6).

55

Ejemplo 5

E3L/MVA050L

ES 2 685 124 T3

<211> 53
 <212> ADN
 <213> Vaccinia Ankara modificado

5 <400> 4
 tagtctgata ttatgagtg cagcaatggc cgtgtacgcg gttactgggtg gtg 53
 <210> 5
 <211> 53
 10 <212> ADN
 <213> Vaccinia Ankara modificado

<400> 5
 ttgatattaa caaaagtga tatatatgtt aataattga ttgtggttat acg 53
 15 <210> 6
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Vaccinia Ankara modificado

20 <400> 6
 agcataaaca caaaatccat caaaaatggt gataaattat ctgatgtgtg tgt 53
 <210> 7
 25 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Vaccinia Ankara modificado

<400> 7
 30 ctggtgggt acgacgagaa tottcatgcc tttcctggaa tatcatcgac tgt 53
 <210> 8
 <211> 53
 <212> ADN
 35 <213> Vaccinia Ankara modificado

<400> 8
 ctggtgtgt tagtctctc taaaatgct taagatctat attgacgagc gtt 53
 40 <210> 9
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Vaccinia Ankara modificado

45 <400> 9
 tgatctcgtg tgtacaaccg aatcatggc gatgtttac gcacacgctc tcg 53
 <210> 10
 <211> 53
 50 <212> ADN
 <213> Vaccinia Ankara modificado

<400> 10
 55 tatgataacgt gaatcatgag tgcaaacgt atgttcaatc tgg 53

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para insertar una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en un genoma de poxvirus, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 A) identificar en el genoma de poxvirus un marco de lectura abierto de poxvirus en el que dicho marco de lectura abierto se **caracteriza por** un codón de inicio ATG inicial y en el que la expresión de dicho marco de lectura abierto es activada por un promotor de poxvirus unido de forma operacional ubicado corriente arriba del marco de lectura abierto y en el que la expresión de dicho marco de lectura abierto proporciona un péptido que no es esencial para la
- 10 viabilidad del poxvirus; e
- B) insertar la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido extraño en una posición aguas abajo del promotor de poxvirus;
- 15 en el que después de dicha inserción,
- (i) el ácido nucleico que codifica el péptido extraño está unido de forma operacional al promotor de poxvirus y la expresión de dicho ácido nucleico es activada por dicho promotor de poxvirus; y
- 20 (ii) la traducción del péptido extraño se inicia en un codón de inicio ATG ubicado en la misma posición con respecto al promotor de poxvirus que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto de poxvirus, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en fase con e inmediatamente después del codón de inicio ATG inicial; o
- la secuencia de ácido nucleico se inserta junto con un codón de inicio en la posición previamente ocupada por el codón
- 25 de inicio inicial del marco de lectura abierto de poxvirus.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño carece de cualquier promotor capaz de activar la expresión del péptido extraño o en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño carece de cualquier promotor.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que después de la inserción de la secuencia del ácido nucleico que codifica un péptido extraño, al menos parte del marco de lectura abierto de poxvirus permanece presente en el genoma de poxvirus.
- 35 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el genoma de poxvirus de la etapa A) comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10 y en el que el codón de inicio del marco de lectura abierto está ubicado en las posiciones 26-28 de una cualquiera de SEQ ID Nos: 1-10; preferiblemente en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño se inserta en fase con (preferiblemente inmediatamente después) el ATG ubicado en
- 40 las posiciones 26-28 de una cualquiera de SEQ ID Nos:1-10.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el poxvirus se selecciona de entre: virus vaccinia, virus vaccinia Ankara modificado (MVA), NYVAC, virus de la viruela aviar y virus de la viruela del canario; preferiblemente en el que el poxvirus es MVA; preferiblemente en el que el marco de lectura abierto de
- 45 poxvirus se selecciona de entre los siguientes marcos de lectura abierta de MVA: 176R, 041L, 027L, 157L, 052R, 005R y 168R.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el poxvirus es virus vaccinia; preferiblemente en el que el marco de lectura abierto de poxvirus se selecciona de entre los siguientes marcos de lectura abierta de virus
- 50 vaccinia: B8R, F11L, K6L, A44L, E5R, C11R, B2R y E3L.
7. Un vector de poxvirus que comprende:
- al menos un transgén;
- 55 en el que dicho transgén comprende un promotor de poxvirus y una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño, y en el que dicho promotor de poxvirus está ubicado aguas arriba de dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño;
- en el que dicho promotor de poxvirus está unido de forma operacional a dicha secuencia de ácido nucleico y la expresión de dicha secuencia nucleica está activada por dicho promotor de poxvirus;

- en el que el promotor de poxvirus es un promotor que activa la expresión de un marco de lectura abierto que no es esencial para la viabilidad de un poxvirus de origen natural;
- en el que dicha secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño incluye un codón de inicio ATG ubicado en la misma posición con respecto al promotor de poxvirus que el codón de inicio ATG de dicho marco de lectura
- 5 abierto de poxvirus no esencial; y
- en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño está en fase con e inmediatamente después del codón de inicio ATG inicial; o
- la secuencia de ácido nucleico junto con un codón de inicio ocupa la posición previamente ocupada por el codón de inicio ATG inicial del marco de lectura abierto de poxvirus.
- 10
8. El vector de poxvirus de la reivindicación 7, en el que está presente al menos parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica el marco de lectura abierto de poxvirus no esencial.
9. El vector de poxvirus de una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en el que el vector de poxvirus
- 15 comprende los nucleótidos 1-25 de una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10, o los nucleótidos 1-25 de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con una cualquiera de SEQ ID NOs: 1-10; preferiblemente, en el que el codón de inicio ATG del marco de lectura abierto está ubicado en una posición inmediatamente aguas abajo de dichos nucleótidos 1-25; preferiblemente en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido extraño está ubicada en fase con (preferiblemente inmediatamente después) el codón de inicio
- 20 ATG ubicado en una posición inmediatamente aguas abajo de dichos nucleótidos 1-25.
10. El vector de poxvirus de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que el poxvirus se selecciona de entre: virus vaccinia, virus vaccinia Ankara modificado (MVA), NYVAC, virus de la viruela aviar y virus de la viruela del canario; preferiblemente en el que el poxvirus es MVA o virus vaccinia.
- 25
11. El vector de poxvirus de la reivindicación 10, en el que el marco de lectura abierto de poxvirus se selecciona de entre los siguientes marcos de lectura abierta de virus vaccinia: B8R, F11L, K6L, A44L, E5R, C11R, B2R y E3L.
- 30
12. Un vector de poxvirus según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, para su uso en medicina; preferiblemente para su uso en el tratamiento o prevención de al menos una enfermedad infecciosa; preferiblemente en el que al menos una enfermedad infecciosa se selecciona de entre el grupo que consiste en: malaria, gripe, VIH/SIDA y tuberculosis.
- 35
13. Una composición farmacéutica, tal como una composición inmunológica, que comprende:
- un vector de poxvirus según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11; y
- un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- .

Figura 1

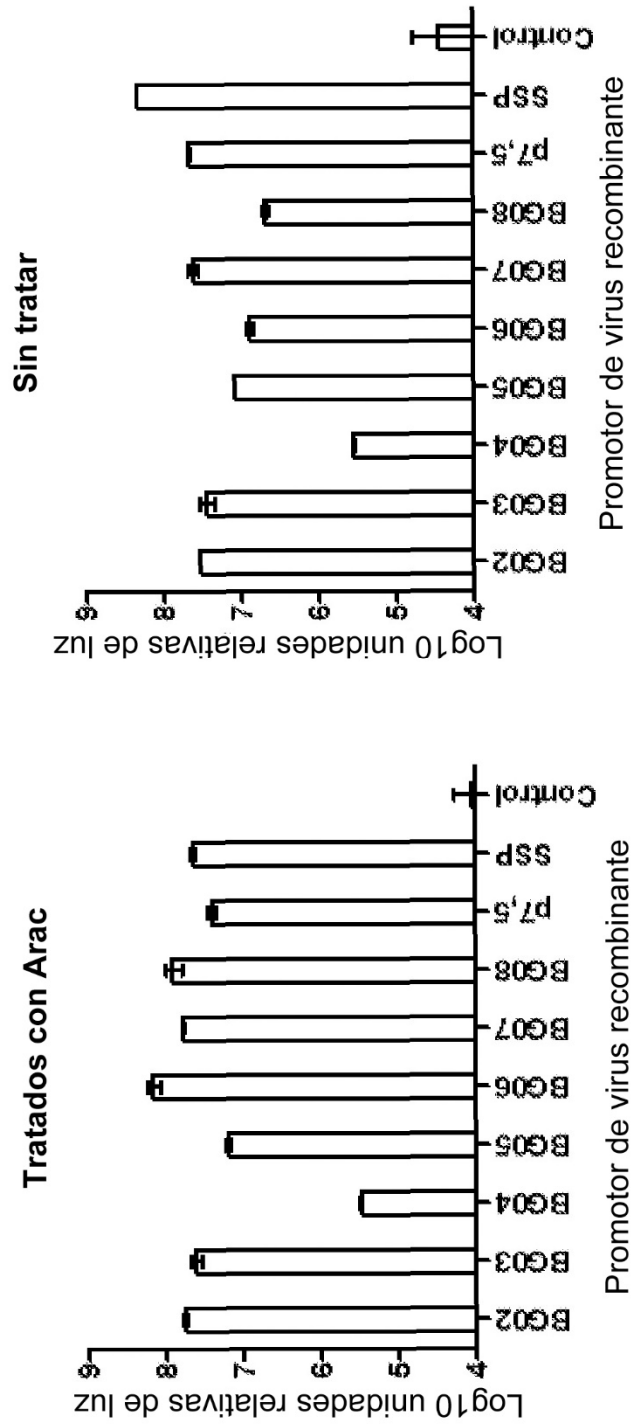


Figura 2

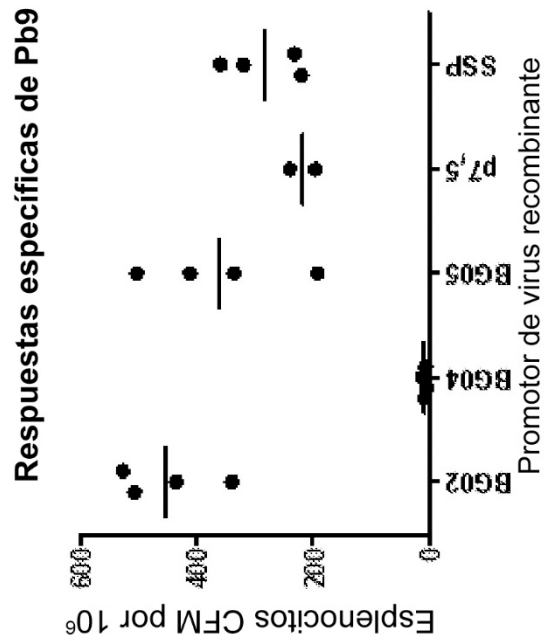
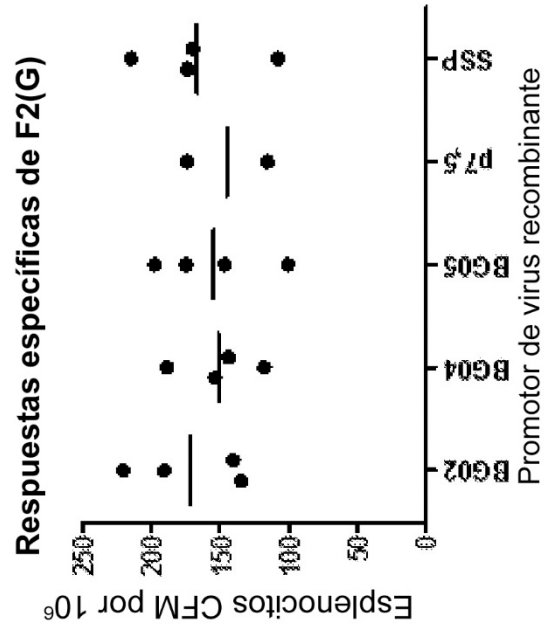


Figura 3

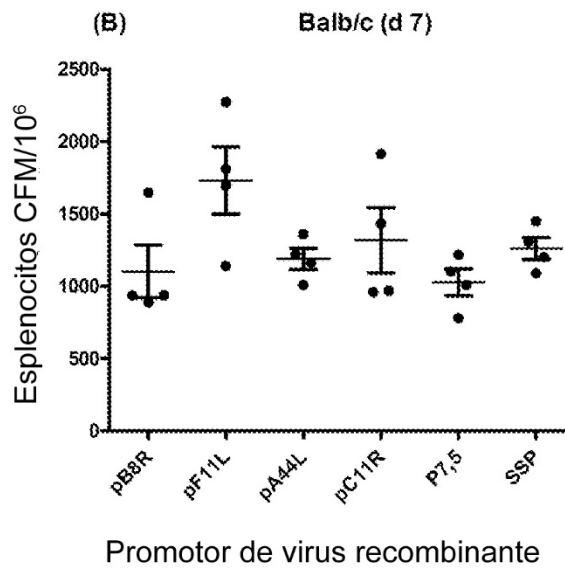
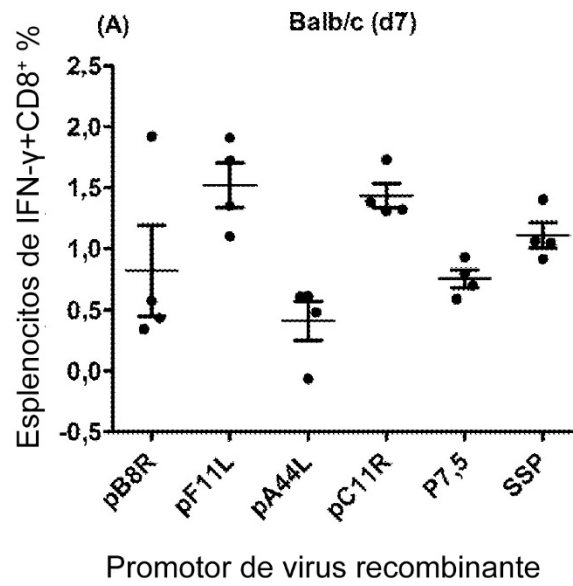


Figura 4

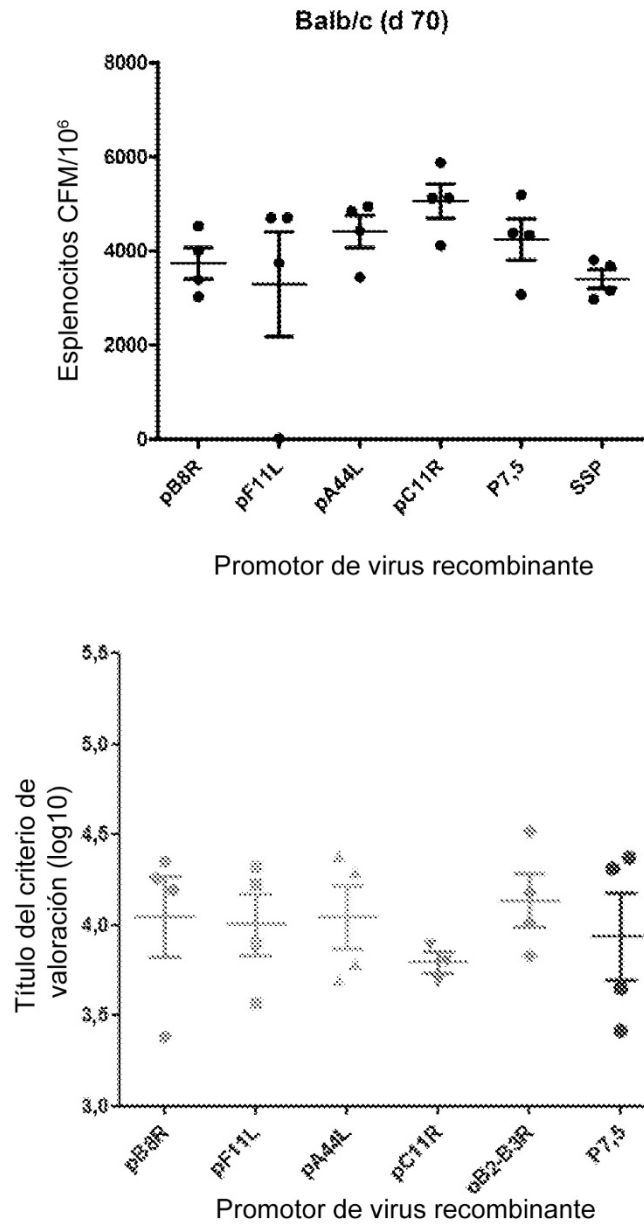


Figura 5a

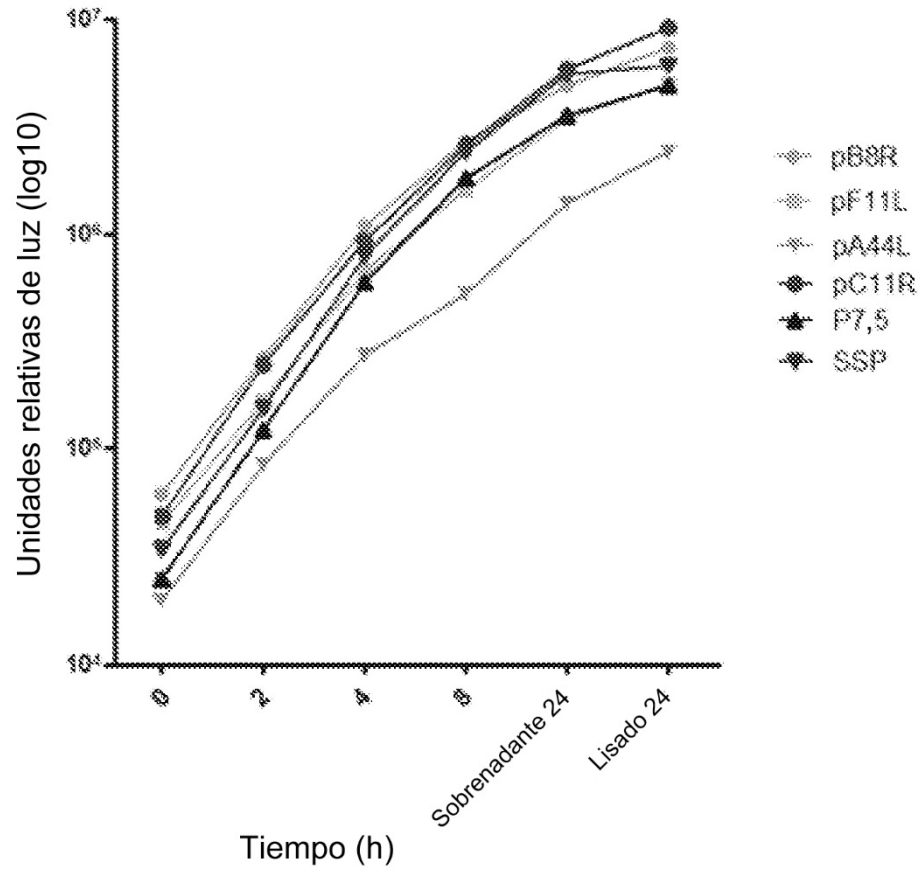


Figura 5b

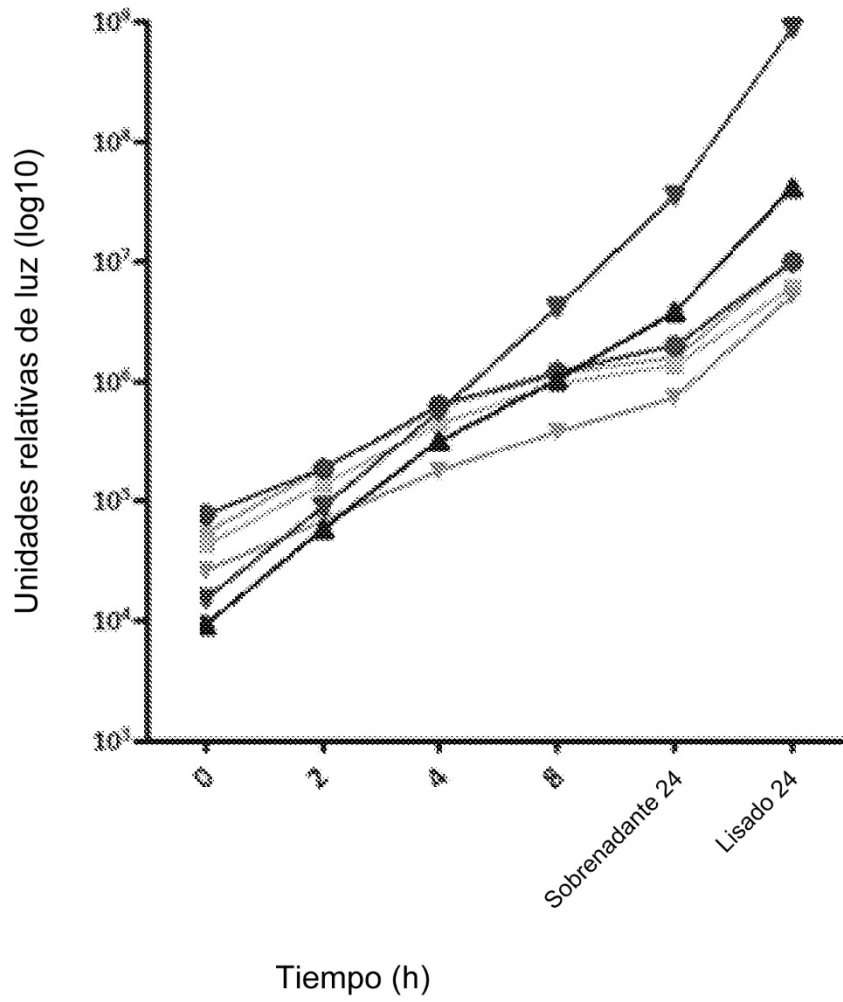


Figura 6

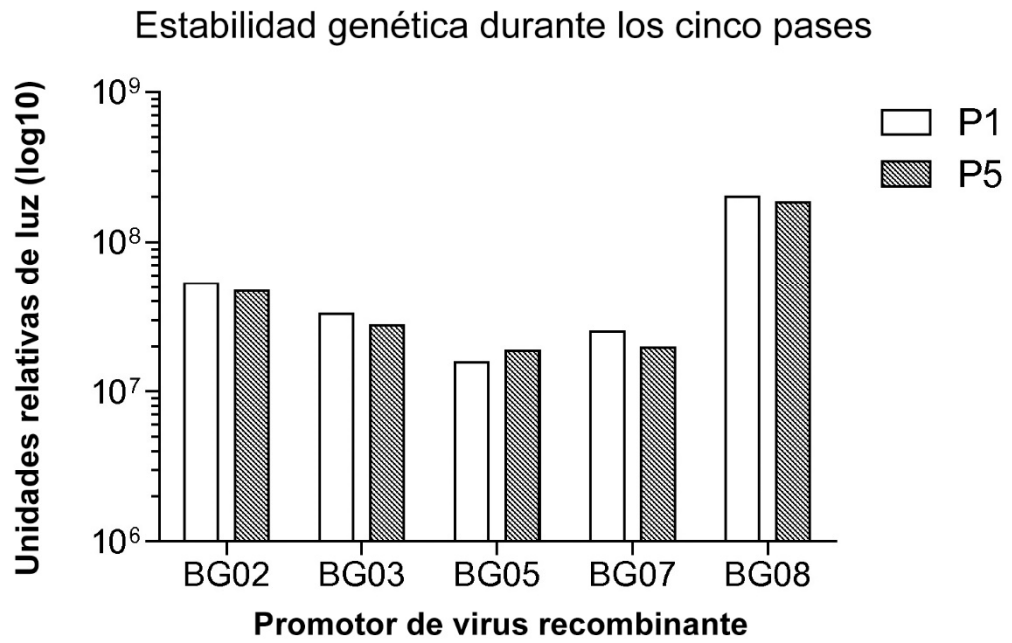


Figura 7

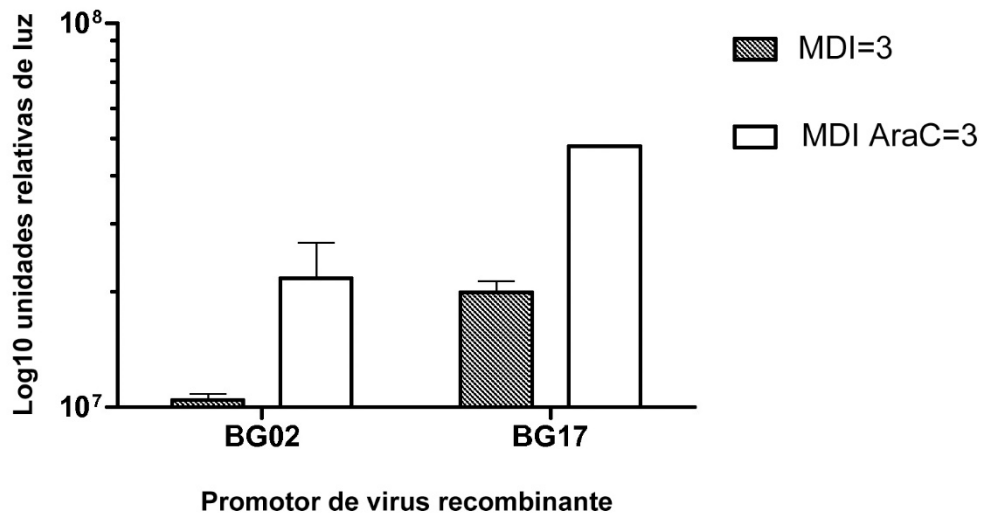


Figura 8

